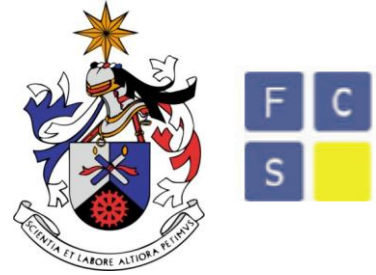


Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



**DESENVOLVIMENTO e IMPLEMENTAÇÃO de novos
protocolos na PURIFICAÇÃO de ANTICORPOS**

Mestrado em Ciências Biomédicas

Ana Margarida Grilo Gonçalves

Junho de 2010

Universidade da Beira Interior

Faculdade de Ciências da Saúde



**DESENVOLVIMENTO e IMPLEMENTAÇÃO de novos
protocolos na PURIFICAÇÃO de ANTICORPOS**

**DEVELOPMENT and IMPLEMENTATION of new
protocols for ANTIBODY PURIFICATION**

Orientada pelo Professor Doutor Luís António Paulino Passarinha e pela
Professora Doutora Fani Pereira de Sousa.

Termo de responsabilidade:

O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva responsabilidade da autora:

Ana Margarida Grilo Gonçalves

Agradecimentos:

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Luís Passarinha e Prof. Dr. Fani Sousa, sempre disponíveis nos momentos em que necessitei do seu auxílio. Agradeço a simpatia e dedicação que demonstraram no decorrer deste trabalho e pela forma agradável e profissional como sempre me trataram, transformando esta jornada de aprendizagem num processo empolgante de formação, reflexão e prazer.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, encorajaram e motivaram a seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus colegas de laboratório do Centro de Investigação em Ciências da Saúde, em especial aos meus colegas de curso, por me terem apoiado e ouvido nos momentos em que o trabalho não corre como o esperado, tendo sempre uma palavra amiga de consolo e ânimo a dar.

Aos amigos, que mesmo estando longe, conseguem quebrar distâncias e transformar um simples telefonema, num abraço de força e carinho.

Resumo

Com uma sociedade em constante desenvolvimento e crescimento, o ser humano procura novos meios para prolongar o seu tempo de vida. Como tal, e com o objectivo de alcançar a manutenção da saúde pública, é necessário desenvolver e prescrever terapias correctas, sendo imprescindível possuir testes de diagnóstico céleres e com limites de detecção eficazes, que veiculem uma informação fidedigna ao clínico. Assim, os anticorpos, como biomolécula que apresenta uma elevada afinidade para o antigénio, são um ponto de interesse para aplicações tanto a nível terapêutico como para testes de diagnóstico. Após a sua produção, recorrendo a tecnologia recombinante, o processo de recuperação das imunoglobulinas (Igs) envolve vários passos de filtração, inactivação viral, bem como a aplicação de diversas técnicas cromatográficas. O produto é assim submetido a várias técnicas, correndo o risco de haver a introdução de novos contaminantes e perdas durante o processo de manipulação do mesmo. Deste modo, torna-se essencial investigar, desenvolver e otimizar processos de produção, fragmentação, purificação e redução de anticorpos, que permitam uma recuperação do produto mantendo as suas características morfológicas e funcionais, a um custo aceitável. Este projecto tem como objectivo, estudar novos métodos de purificação de diferentes anticorpos e fragmentos de anticorpos para posterior utilização em testes de diagnóstico. Recorrendo à técnica de cromatografia de exclusão molecular, pretende-se purificar os fragmentos de ligação ao anticorpo $F(ab)'_2$ e $F(ab)'$, que posteriormente serão imobilizados na superfície do biosensor.

Palavras-chave: Anticorpos, Fragmentos de Anticorpos, Purificação, Cromatografia de Exclusão molecular, dispositivos de diagnóstico.

Abstract

With a society in constant development and grow, the human being search for new ways to prolong their half life time. As such, and with the goal to achieve the maintenance of the public health, is necessary to develop and prescribe correct treatments, being indispensable hold fast tests of diagnosis with a efficient limit of detection, that convey a reliable information to the clinic. So, the antibodies, as a biomolecule which presents a high affinity to the antigen, constitute a point of interest to therapeutic and diagnosis applications. Behind the production, which resorts to recombinant technology, the process of recovery of immunoglobulin's (Igs) involves several filtration steps, viral inactivation, as well as the application of multiple chromatography techniques. The product is therefore subject to several techniques and the risk of the introduction new contaminants and product loss during the manipulation increases. Thus, becomes essential to explore, to develop and to optimize the processes of production, fragmentation, purification and reduction of antibodies, that allow a product recovery that keep the morphologic and functional characteristics of the product, in a acceptable cost. This project has as goal, the study of new purification methods to different antibodies, and antibody fragments to ulterior application in diagnosis test. Using exclusion molecular chromatography, we intended to purify the fragments of antigen binding $F(ab)_2$ and $F(ab)'$, for ulterior immobilization over the biosensor surface

Key-Words: Antibodies, Fragments of antibodies, Purification, Size Exclusion Chromatography, medical devices.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Igs	Imunoglobulinas
F(ab)'₂	Fragmento de ligação ao antigénio
F(ab)	Fragmento de ligação ao antigénio
Células NK	Células Natural Killers
V	Regiões variáveis
C	Regiões constantes
C_L	Domínio constante da cadeia leve
V_L	Domínio variável da cadeia leve
C_{H1}	Domínio constante da cadeia pesada
C_{H2}	Domínio constante da cadeia pesada
C_{H3}	Domínio constante da cadeia pesada
V_H	Domínio variável da cadeia pesada
Fv	Fragmento variável
CDRs	<i>Complementarity-determining regions</i>
Fc	Fragmento cristalizável
FcRn	Receptor neonatal
κ	Kappa
λ	Lambda
IgG	Imunoglobulina G
MAbs	Anticorpos Monoclonais
PAbs	Anticorpos Policlonais
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
GS	<i>Glutamine Synthetase</i>
DHFR	<i>Dihydrofolate reductase</i>
IUPAC	<i>International Union Pure and Applied Chemistry</i>
SEC	Cromatografia de Exclusão Molecular
IEX	Cromatografia de Troca Iónica
HIC	Cromatografia de Interação Hidrofóbica
RPC	Cromatografia de Fase Reversa

AC	Cromatografia de Afinidade
Anti-CRP	Monoclonal anti-human C-reactive protein
Anti-Avidin	Monoclonal mouse anti-egg white avidin
Anti-PSA	Monoclonal mouse anti-prostate specific antigen
PBS-EDTA	Ácido etilenodiaminico tetra-acético em tampão fosfato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
i.d.	Diâmetro interno
MWCO	Membrane Molecular-Weight Cutoff
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura de uma imunoglobulina	2
Figura 2	<i>Diferentes classes de imunoglobulinas</i>	4
Figura 3	<i>Esquema representativo da acção das enzimas proteolíticas pepsina e papaína</i>	7
Figura 4	<i>Técnica de produção de hibridomas</i>	9
Figura 5	<i>SpinIt Panels</i>	11
Figura 6	Esquema representativo da constituição e funcionamento de um biosensor	13
Figura 7	<i>Esquema de sistema de detecção de SPR</i>	14
Figura 8	Evolução no desenvolvimento de anticorpos	16
Figura 9	<i>Modelo fed-batch</i>	18
Figura 10	<i>Modelo de perfusão contínua</i>	19
Figura 11	<i>Exemplo de processo de produção de anticorpos</i>	20
Figura 12	Diferentes tipos de interacções e subsequentes técnicas cromatográficas	22
Figura 13	Esquema representativo do processo de separação de uma amostra por meio da utilização da técnica cromatográfica	24
Figura 14	Esquema representativo do processo de cromatografia de exclusão molecular	27
Figura 15	<i>Sistema de cromatografia líquida Äkta Purifier</i>	32
Figura 16	Recta de Calibração de área vs concentração de $F(ab)'_2$	35
Figura 17	Recta de Calibração de altura vs concentração de $F(ab)'_2$	35
Figura 18	Imagens ilustrativas do processo de diálise	36
Figura 19	Diagrama global do processo	39
Figura 20	Perfil cromatográfico da fase móvel PBS-EDTA a pH6,9	40
Figura 21	Estudo do comportamento do anticorpo Anti-CRP e do fragmento $F(ab)'_2$ puro	42
Figura 22	Perfil cromatográfico do fragmento $F(Ab)'_2$ por exclusão molecular	43
Figura 23	Análise das fracções de $F(ab)'_2$ por cromatografia analítica de exclusão molecular	45

Figura 24	Perfil cromatográfico do branco da reacção de redução	46
Figura 25	Perfil cromatográfico da amostra de F(ab)' ₂ após o processo de redução	47
Figura 26	Perfil cromatográfico resultante da diálise da amostra resultante da reacção de redução do fragmento F(ab)' ₂	48
Figura 27	Estudo do comportamento do anticorpo Anti-Avidin e do fragmento F(ab)' ₂ de Anti-Avidin puro.	50
Figura 28	Perfil cromatográfico do fragmento F(Ab)' ₂ Anti-Avidin por exclusão molecular	51
Figura 29	Análise das fracções de F(ab)' ₂ de Anti-Avidin obtidas na cromatografia preparativa por cromatografia analítica de exclusão molecular.	52
Figura 30	Perfis cromatográficos do anticorpo Anti-PSA	54
Figura 31	Perfil cromatográfico da reacção de fragmentação do anticorpo Anti-PSA	55

Lista de Tabelas

Tabela 1	Diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas e suas características estruturais e funcionais	5
Tabela 2	Distribuição normal das subclasses de IgG no soro humano segundo cinco grupos científicos diferentes	6
Tabela 3	Diferentes tipos de testes baseados em MAbs para prever uma gravidez	10
Tabela 4	Interações e respectivos sistemas cromatográficos	23
Tabela 5	Tempos de retenção, área e altura dos cromatogramas apresentados na figura 22	43
Tabela 6	Tempos de retenção, área e altura dos cromatogramas da figura 23	44
Tabela 7	Tempos de retenção, área e altura de picos dos cromatogramas apresentados na figura 25	47

Índice

I. Introdução	1
1.1 Anticorpo: Estrutura e Função	2
1.1.1 Anticorpos: Policlonais vs Monoclonais	8
2 A aplicação dos anticorpos ao diagnóstico	11
3 Desenvolvimento e produção de anticorpos	16
4.1 Purificação de Anticorpos	21
4.1.1 Aspectos gerais da técnica cromatográfica	22
4.2 Cromatografia de afinidade	24
4.3 Cromatografia de troca iónica	25
4.4 Cromatografia de interacção hidrofóbica	26
4.5 Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel	27
5. Objectivos	29
II. Materiais e Métodos	30
2.1 Material	31
2.1.1 Anticorpos monoclonais	31
2.1.2 Equipamento	32
2.2 Estudos de Cromatografia de Exclusão Molecular ou Filtração em Gel	33
2.2.1 Cromatografia Analítica	33
2.2.2 Cromatografia Preparativa	34
2.3 Fragmentação	34
2.4. Construção da recta de calibração	35
2.5 Redução e Diálise	36
III. Resultados e Discussão	38
3.1 Diagrama global do processo	39
3.2 Estudos do anticorpo Anti-CRP	41
3.2.1 Fragmentação do anticorpo Anti-CRP	41
3.2.2 Purificação do fragmento F(ab) ₂	43

3.2.3	Ensaaios de Redução e Diálise	46
3.3	Estudo do anticorpo Anti-Avidin	49
3.3.1	Fragmentação do anticorpo Anti-Avidin	49
3.3.2	Purificação do fragmento F(ab)₂'	51
3.4	Estudo do anticorpo Anti-PSA	53
3.4.1	Fragmentação do anticorpo	53
IV.	Conclusão e Perspectivas Futuras	56
V.	Referências Bibliográficas	58

I. Introdução

1.1 Anticorpo: Estrutura e Função

Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) solúveis são glicoproteínas segregadas pelos plasmócitos (linfócitos B diferenciados) presentes no sangue e fluidos tecidulares com especificidade para moléculas antigénicas específicas (que induziram a síntese desses mesmos anticorpos), às quais se ligam para desencadear uma série de respostas imunológicas com vista à destruição do agente transportador desse antígeno. Para além de constituírem 20% das proteínas plasmáticas humanas, também podem ser encontrados na superfície de algumas células, como é o caso dos fagócitos mononucleares, as células Natural Killers (NK) e os mastócitos. Devido à sua capacidade de circulação são capazes de ir ao encontro dos antígenos, exercendo a sua função efectora. Assim, os anticorpos são o elemento de reconhecimento da resposta imune humoral, sendo o braço effector do sistema imune adaptativo, responsável pela defesa contra os microrganismos extracelulares e toxinas microbianas (Arosa, F. et al., 2007)(Josic, D. and Lim, Y. 2001; Lipman, N. et al. 2005).

Todas as imunoglobulinas possuem uma estrutura básica similar em forma de Y. Esta representação convencional das imunoglobulinas, apresenta uma estrutura central simétrica, com uma massa total de 150KDa, sendo composta por quatro cadeias polipeptídicas, idênticas duas a duas tal como mostra a figura 1 (Lima, N. M., M. 2003; Lipman, N. et al. 2005).

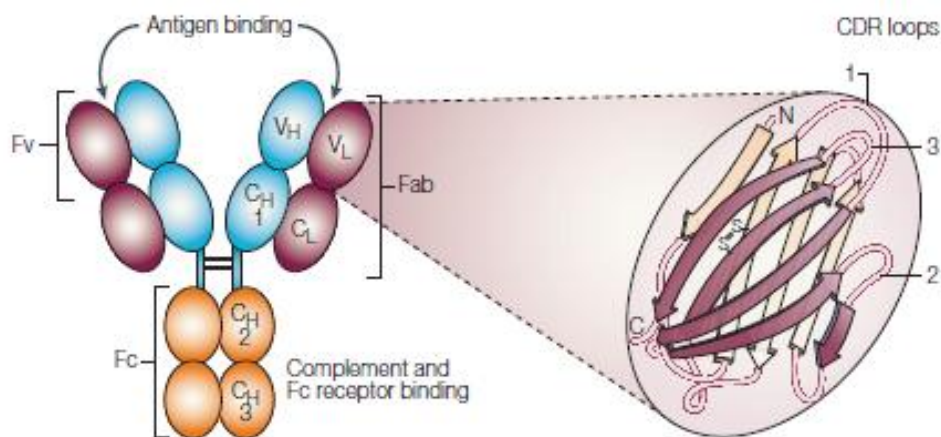


Figura 1 – Estrutura de uma imunoglobulina (adaptado de Brekke, O. and Sandlie, I., 2003)

Pela representação da imunoglobulina, pode verificar-se que esta é constituída por duas cadeias pesadas (H) idênticas de 50-77KDa unidas por meio de pontes dissulfureto (S-S), e que cada uma, por sua vez, se liga a uma das duas cadeias leves (L) idênticas, de 25KDa (Carter, P. 2006; Lipman, N. et al. 2005) .

Tanto as cadeias pesadas como as cadeias leves contêm uma série de unidades homólogas repetidas, cada uma com cerca de 110 resíduos de aminoácidos, que se envolvem independentemente num motivo globular, classificado como domínio de imunoglobulina, estabilizado por meio de ligações dissulfureto intra cadeia. Um domínio de Ig, contém duas camadas de folhas β pregueadas, sendo cada camada composta de três a cinco filamentos de cadeia polipeptídica antiparalelas, como se pode observar na ampliação da figura 1 (Abbas, A. L., A.; Pober, J. 2003)

Verifica-se que, tanto as cadeias pesadas como as cadeias leves constam de regiões variáveis (V) e de regiões constantes (C), sendo que cada cadeia leve, é composta por um domínio constante (C_L) e um domínio variável (V_L), enquanto cada cadeia pesada, é constituída por três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) e um domínio variável (V_H). Em adição, as cadeias pesadas exibem uma pequena sequência rica em resíduos de prolina a unir os domínios CH_1 e CH_2 , sendo esta região flexível designada por Hinge (Brekke, O. and Sandlie, I. 2003; Carter, P. 2006; Walsh, G. 2003).

A região F_v é composta pela justaposição dos domínios variáveis tanto da cadeia pesada (V_H) como da cadeia leve (V_L), formando o local de ligação ao antigénio. Dentro desses domínios (V_H e V_L) verifica-se a existência de três loops, designados por *complementarity-determining regions* (CDRs) 1, 2 e 3 que conferem elevada diversidade e definem a especificidade da ligação do anticorpo, sendo que cada anticorpo, apresenta uma afinidade específica para com o material estranho que estimulou a sua síntese. Esta afinidade, não é para com a totalidade da macromolécula do antigénio, mas sim, para com um local específico, designado por determinante antigénico ou epítopo.

Por sua vez, a região designada por fragmento de ligação ao anticorpo ($F(ab)'$) compreende a região F_v , responsável pela ligação ao antigénio, e dois domínios C. O par resultante, de uma cadeia leve e uma cadeia pesada, ligam este “braço”, à restante estrutura do anticorpo pela região da hinge. Pelo facto de a unidade estrutural central de cada molécula de anticorpo, conter duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, ela possui portanto, dois locais de ligação ao antigénio. (Brekke, O. and Sandlie, I. 2003; Kent, U. 1999) .

A porção designada por fragmento cristalizável (F_c) é glicosilada e constituída pelas regiões constantes (C) das cadeias pesadas, que por sua vez, interagem com

outras moléculas e células efectoras do sistema imune, como por exemplo, o complexo C1 do sistema complemento, bem como, uma variedade de receptores Fc, incluindo o receptor neonatal (FcRn). Deste modo, esta porção medeia a maioria das funções biológicas dos anticorpos (Brekke, O. and Sandlie, I. 2003). Por sua vez, as regiões C das cadeias leves, não participam das funções efectoras e não são inseridas nas membranas celulares. No entanto, as funções efectoras e as propriedades físico-químicas dos anticorpos, encontram-se associadas à porção não ligante, que exhibe poucas variações entre os diferentes anticorpos (Kent, U. 1999; Lima, N. M., M. 2003).

Consoante o número de unidades Y, bem como o tipo de cadeia pesada (γ , μ , α , δ e ϵ) assim teremos anticorpos pertencentes à classe: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Tendo por base pequenas diferenças na estrutura polipeptídica, as cadeias leves podem ser classificadas como kappa (κ) ou lambda (λ). Contudo, são as cadeias pesadas que determinam a subclasse de cada anticorpo, que diferem no número de ligações dissulfureto e no comprimento da região da hinge, como se pode observar na figura 2 e na tabela 1 (Huse, K. et al. 2002; Walsh, G. 2003)

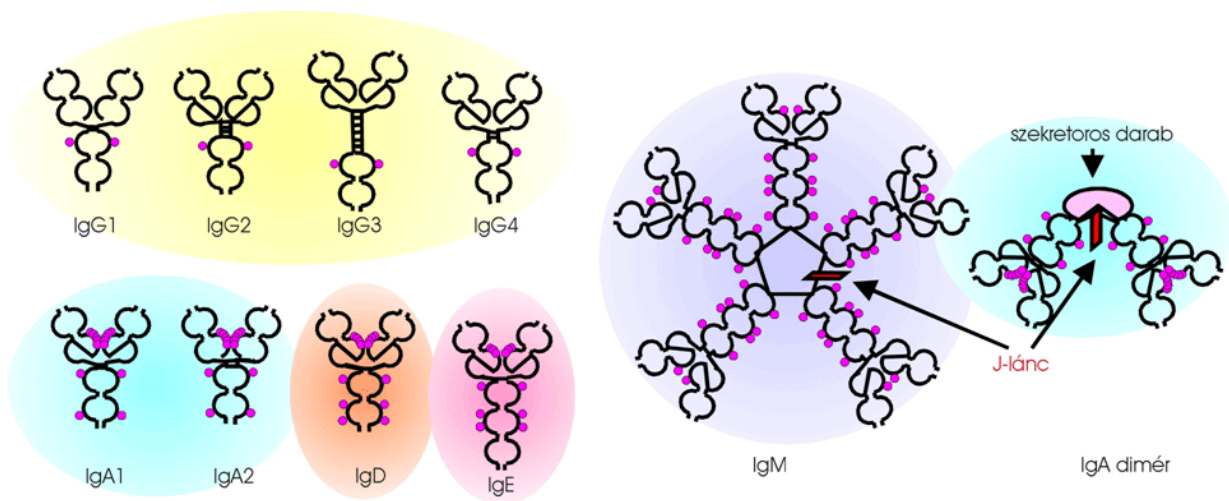


Figura 2 – Diferentes classes de imunoglobulinas (adaptado abc-arrays.com/techdetails/ig_classes.gif)

Tabela 1 – Diferentes classes e subclasses de imunoglobulinas e suas características estruturais e funcionais (adaptado de International, C., 2010)

Classe/ subclasse	Cadeia Pesada	Cadeia Leve	Peso Molecular (kDa)	Estrutura	Função
IgA1	α1	λ ou κ	150 a 600	Monómero a Tetramero	Ig mais produzida; protege a superfície da mucosa; resistente à digestão; secretada no leite
IgA2	α2				
IgD	Δ	λ ou κ	150	Monómero	Função não clara; Trabalha com a IgM no desenvolvimento de células B; maioria das ligações às células B
IgE	E	λ ou κ	190	Monómero	Defesa contra parasitas; causa reacções alérgicas
IgG1	γ1	λ ou κ	150	Monómero	Maior Ig no soro; boa opsonização; moderador do complemento; pode atravessar a placenta
IgG2a	γ2				
IgG2b	γ2				
IgG3	γ3				
IgG4	γ4				
IgM	μ	λ ou κ	900	Pentamero	Anticorpo de resposta primário; bom opsonizador

A IgG é considerada a Ig que se apresenta em maior quantidade no soro humano. Existe, a uma concentração aproximada de 12mg/mL e representa cerca de 15% da proteína sérica total (incluindo albumina e outras globulinas). Esta classe de imunoglobulina difunde-se com grande facilidade através dos vasos sanguíneos, de tal forma que a sua distribuição intravascular e extravascular é idêntica. É capaz de atravessar a placenta, permitindo assim, que a mãe transmita a sua imunidade para o feto. Surge também no colostro e no leite materno, desempenhando um papel vital, na protecção passiva do recém-nascido contra infecções. Reage com os epitopos de microrganismos via região Fab, mas é a região Fc que confere a propriedade de opsonização, ou seja, permite que as células fagocíticas (monócitos, macrófagos e

fagócitos polimorfonucleares) se liguem à sua porção Fc (após ligação da IgG ao antigénio), facilitando a fagocitose do microrganismo. Da mesma forma, a fixação da IgG ao antigénio, permite a activação do complemento, acelerando a resposta inflamatória (Lima, N. M., M. 2003). Esta classe de Ig é subdividida em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), sendo a IgG1 e a IgG4 as que registam respectivamente os valores de maior e menor concentração, como se pode observar na tabela 2 (Hamilton, R. 2001; Shakib, F. and Stanworth, D. 1980).

Tabela 2 – Distribuição normal das subclasses de IgG no soro humano segundo cinco grupos científicos diferentes (adaptado de Shakib, F. and Stanwrth, D. ,1980)

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Referência	%	%	%	%
Yount et al, 1970	66,0	23,0	7,0	4,0
Leddy et al., 1970	64,0	28,0	5,0	3,0
Morell et al.,1971	60,8	29,5	5,4	4,3
Shakib et al., 1975	71,5	19,4	8,4	0,7
Van der Giessen et al., 1975	58,4	31,3	5,4	4,9

A fragmentação do anticorpo IgG é muitas vezes útil, uma vez que os fragmentos F(ab) e F(ab)₂ podem ligar-se ao antigénio, sem activar os mecanismos efectores dependentes da região Fc. Como foi referido anteriormente, a região da hinge liga duas cadeias pesadas, permitindo ao anticorpo, uma capacidade rotacional de adaptação às diferentes apresentações antigénicas. No entanto, esta região que apresenta a principal ligação dissulfureto pode ser quebrada por acidificação ou redução das ligações. Como a região é rica em prolina, é susceptível à proteólise por parte das enzimas papaína e pepsina como se pode observar na figura 3 (Lipman, N. et al. 2005).

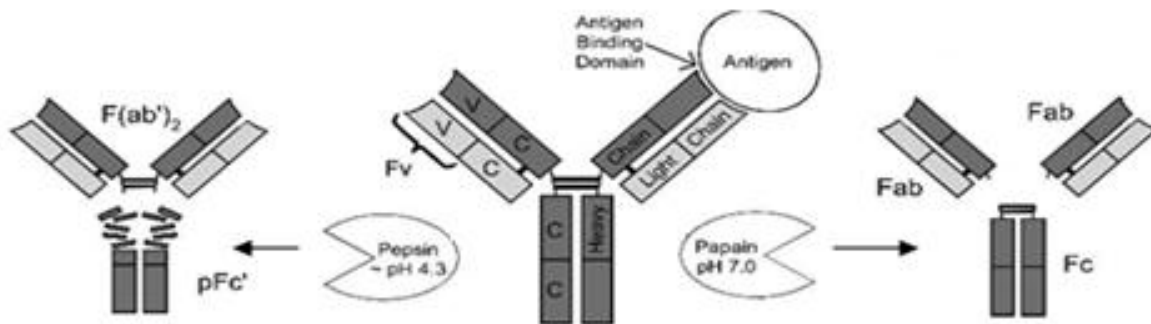


Figura 3 – Esquema representativo da acção das enzimas proteolíticas pepsina e papaína (adaptado de Lipman N. 2005)

Quando a enzima papaína é utilizada, esta vai cortar a molécula acima da região da hinge, dando origem a dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) idênticos, cada qual com um único local de combinação para o antígeno, e um terceiro fragmento, o fragmento cristalizável (Fc), que não possui capacidade de ligar o antígeno. Por sua vez, a enzima pepsina, actua num ponto diferente, de modo a separar o fragmento Fc do resto da molécula, designada por $F(ab)'_2$. Uma vez que, o fragmento $F(ab)'_2$ é ainda bivalente em relação à ligação com o antígeno, exactamente como o anticorpo original, apresenta uma maior avidéz para com o antígeno, do que os dois fragmentos Fab produzidos pela clivagem da papaína (Abbas, A. L., A.; Pober, J. 2003; Lipman, N. et al. 2005). No entanto, o fragmento $F(ab)'_2$ obtido pela fragmentação com a pepsina, pode ainda ser reduzido, através da utilização de agentes redutores de modo a obter, dois fragmentos $F(ab)'$ (Pereira, M. and Lai, E. 2008).

1.1.1 Anticorpos: Policlonais vs Monoclonais

O elevado grau de afinidade e especificidade para com o antígeno, fez dos anticorpos, alvo de aplicações científicas e médicas, na utilização tanto em terapias como em ensaios de diagnósticos, contribuindo para uma melhoria da saúde pública. Como tal, e com base na finalidade do anticorpo, assim são utilizados anticorpos policlonais ou anticorpos monoclonais.

Os anticorpos policlonais (PAbs), resultantes da activação de diferentes linhas de linfócitos B, apresentam elevada especificidade, uma vez que cada linfócito B vai produzir um anticorpo, para um epítopo diferente do antígeno. Esta característica permite uma maior tolerância a alterações morfológicas, como por exemplo, polimorfismos, heterogeneidade da glicosilação, ou pequenas desnaturações. Os anticorpos policlonais sendo produzidos contra o mesmo antígeno em múltiplos animais, podem ser gerados mais rapidamente que os anticorpos monoclonais (MAbs), apresentando custos de produção mais baixos que os requeridos para a produção de MAbs e utilizando um menor número de técnicas. No entanto, estes anticorpos policlonais vão diferir entre eles, consoante o animal imunizado em que foram produzidos, sendo que a quantidade de PAbs vai ser também dependente do tamanho e tempo de vida do animal em que é produzido (Lipman, N. et al. 2005).

Por sua vez, uma população de anticorpos homogénea, isto é, de MAbs, pode ser criada através da fusão de duas linhas celulares diferentes: as células do mieloma (geralmente recolhidas a partir de ratos) e os plasmócitos do baço (linfócitos B) capazes de produzir anticorpos que reconheçam antígenos específicos. O resultado desta fusão, designa-se por hibridoma, e possui algumas características das células originais, isto é, a capacidade de sobrevivência e reprodução em cultura (imortalidade) das células do mieloma, e a capacidade de produção de anticorpos específicos por parte dos plasmócitos. Esta metodologia, conhecida por tecnologia do hibridoma, compreende cinco etapas fundamentais que se apresentam sucintamente na figura 4 e que se referem à imunização do animal; ao isolamento dos linfócitos B do baço produtores de anticorpos; à fusão dos linfócitos com as células tumorais e formação dos hibridomas; ao isolamento dos hibridomas; ao crescimento clonal de tais hibridomas e à colheita das culturas de anticorpos monoclonais puros.

Uma das vantagens dos MAbs em relação aos PAbs, prende-se com o facto de os hibridomas crescerem em grande quantidade, podendo obter-se quantidades ilimitadas de anticorpo, com especificidade e afinidade conhecidas para com o antígeno original, sem diferença entre lotes. Assim, a mono especificidade

proporciona-lhes uma capacidade de avaliar interacções entre proteínas, estados de fosforilação, bem como alterações na conformação molecular, ou identificar elementos de famílias de proteínas. No entanto, a especificidade pode também limitar a sua utilização, uma vez que pequenas alterações na estrutura do epítopo, em consequência de polimorfismos genéticos, glicosilações e desnaturações podem afectar o seu desempenho. Esta é uma das razões, que explica o facto dos MAb's deverem ser gerados considerando o estado do antígeno com o qual eventualmente irão contactar, de forma a obterem a especificidade que lhes permita realizar eficientes ligações dentro de uma mistura de biomoléculas (Lemke, T. W., D.; Roche, V.; Zito, S. 2008; Lima, N. M., M. 2003; Lipman, N. et al. 2005)

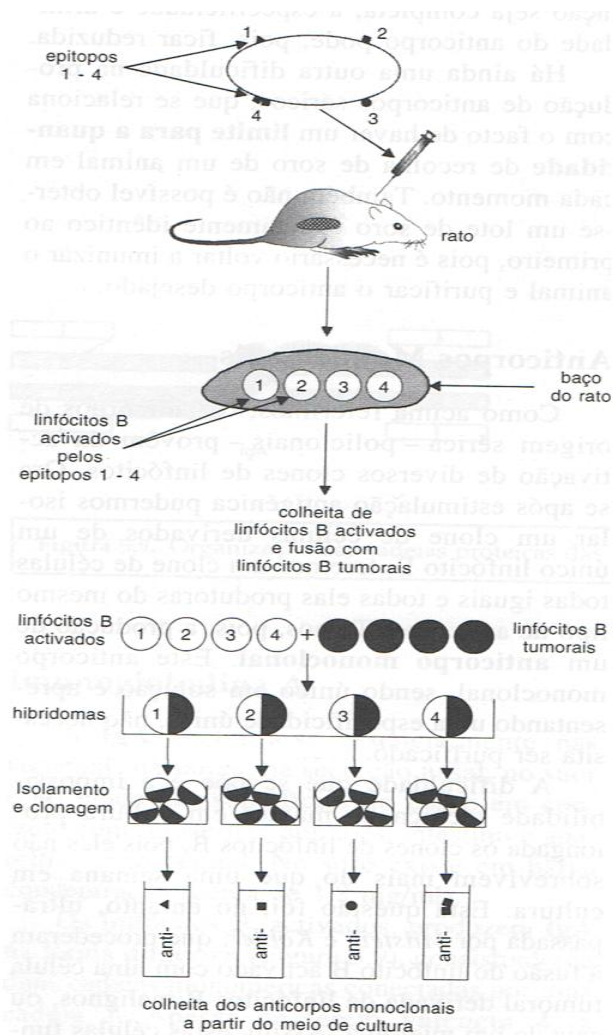


Figura 4 – Técnica de produção de hibridomas (adaptado de Lima, N. et al. , 2003)

Deste modo, se as condições do ensaio se mantiverem constantes, os resultados entre experiências serão mais reprodutíveis que os obtidos com os PAbs. No entanto, os Mabs são bastante susceptíveis a variações de concentração de sal e pH, sem referir que este tipo de produção de anticorpos, requer a utilização de um maior número de técnicas, o que acarreta custos de produção mais elevados. (International, C. 2010; Lemke, T. W., D.; Roche, V.; Zito, S. 2008; Lipman, N. et al. 2005)

Uma vez que os anticorpos monoclonais reagem com apenas um epítopo do antigénio, estes são muito interessantes para aplicações em diagnóstico, tendo sido desenvolvidos testes de diagnóstico médicos capazes de prever uma gravidez, assim como kits capazes de prever o período de ovulação, entre outros. No caso da determinação de uma gravidez, os anticorpos monoclonais em que se baseia o teste, vão detectar as gonadotrofinas coriónicas humanas, hormona produzida se ocorrer fertilização, e cuja concentração aumenta ao longo da gravidez. Por sua vez, na detecção do período fértil, os dispositivos criados, vão detectar a hormona luteinizante que se encontra na urina e é responsável pela maturação do ovo e subsequente ovulação, permitindo deste modo que seja possível verificar o período fértil da mulher (Lemke, T. W., D.; Roche, V.; Zito, S. 2008).

Na tabela 3, encontram-se descritos alguns testes de diagnóstico médico, baseados em MAb.

Tabela 3 – Diferentes tipos de testes baseados em MAb para prever uma gravidez (adaptado de Lemke, T. et al., 2008)

Produto	Distribuidor	Resultado Positivo
Teste de gravidez		
Answer Plus	Carter Products	Sinal positivo na janela de output
Clear Blue Easy	Unipath	Linha azul na janela de output
Conceive	Quidel	Linha rosa a roxo na janela de output
Fact Plus One step	Advanced Care	Sinal mais rosa na janela de output

2. A aplicação dos anticorpos ao diagnóstico

Actualmente, a rápida detecção e quantificação de diferentes agentes patogénicos, como bactérias, fungos e vírus é crucial para prevenir infecções e alcançar a manutenção geral da saúde pública. Para que estes agentes patogénicos que muitas vezes se encontram em baixas quantidades nas amostras, sejam detectados, é essencial desenvolver ensaios e dispositivos de diagnóstico que possuam uma elevada sensibilidade e especificidade para com esses agentes. Os anticorpos, como agentes do sistema imunológico, que detectam os diferentes antigénios, com uma elevada especificidade e afinidade, constituem-se como importantes biomoléculas a estudar para aplicações em dispositivos de detecção, como no caso do sistema Sipinit criado pela empresa Biosurfit, representado na figura 5 (Byrne, B. et al. 2009).



Figura 5 – Sipinit panels (adaptado de www.biosurfit.com, 2010)

Os ensaios imunológicos baseados em anticorpos, são o tipo de ferramenta de diagnóstico mais utilizado, continuando a ser um método tecnológico em crescimento para a análise de biomoléculas, apesar de os anticorpos não serem as únicas moléculas capazes de quantificar antigénios. No entanto, os ensaios baseados em receptores e enzimas, não oferecem em muitos casos a mesma ilimitada aplicabilidade e especificidade (Borrebaeck, C. A. K. 2000).

O primeiro grande passo na consolidação da utilização de anticorpos em ensaios imunológicos, foi o desenvolvimento de ensaios de ligação competitiva, usando radioisótopos e mais tarde enzimas marcadas (Engvall, E. and Perlmann, P. 1971; Yalow, R. and Berson, S. 1959), seguindo-se a introdução dos MAbs por *Köhler* e *Milstein*, pondo de lado, os soros de anticorpos policlonais (PABs) até então utilizados (*Köhler*, G. and *Milstein*, C. 1975). Os MAbs, devido às características que apresentam, podem ser utilizados tanto para identificar uma droga como um alvo, tornando estes anticorpos susceptíveis à utilização em diferentes aplicações biológicas, sendo que na década de 1990, representavam 50% do mercado na área do diagnóstico, constituindo-se nos dias que correm como o imunoreagente predominante. Nos últimos anos, a tendência tem seguido no sentido da especificidade, detecção e sensibilidade, objectivos que têm sido alcançados através do desenvolvimento de diferentes formatos de ensaios competitivos, e não competitivos, dependendo se o antigénio a quantificar compete ou não com o antigénio marcado para com um limitado número de locais de ligação ao anticorpo. Ainda na década de 1990, verificaram-se melhorias no que respeita à automação dos ensaios, resultando na conseqüente redução do tempo de realização dos mesmos, sem comprometer a sua sensibilidade (*Borrebaeck*, C. A. K. 2000; *Cahill*, D. J. 2001). Assim, os biosensores constituem uma ferramenta poderosa na análise de interacções biomoleculares em ambiente clínico, bioquímico e ambiental, podendo ser descritos como um transdutor que incorpora um componente de reconhecimento biológico, como elemento funcional chave. Num biosensor, a selectividade e especificidade dependem em muito do elemento de bioreconhecimento que é capaz de detectar a presença do analito. Actualmente, encontram-se biosensores para a detecção de vários analitos, recorrendo a uma ampla gama de transdutores de sinal, podendo o elemento de transdução ser piezoeléctrico, electroquímico ou óptico e capaz de traduzir o reconhecimento selectivo entre o analito e o elemento de bioreconhecimento, num sinal mensurável pelo sistema e apresentá-lo no display de saída, tal como se pode observar na figura 6 (*Conroy*, P. et al. 2009).

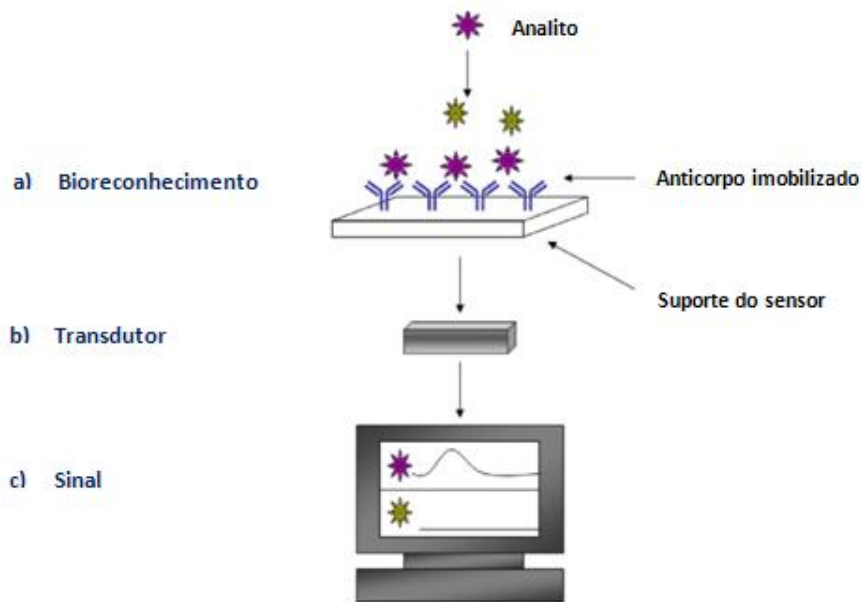


Figura 6 – Esquema representativo da constituição e funcionamento de um biossensor (adapto Conroy, Hearty e tal. 2009)

Os sensores imunológicos baseados na imobilização de anticorpo têm revolucionado a detecção de drogas e hormonas no meio clínico e farmacêutico. Contudo, alguns problemas associados com a perda de actividade biológica, após a imobilização do anticorpo, têm sido descritos, sendo a orientação do anticorpo na superfície do sensor uma das principais causas para este problema. Assim, para desenvolver um sensor de elevada performance, é preciso realizar uma imobilização com orientação, sendo para tal necessário, proceder à fragmentação e redução do anticorpo de forma a obter o fragmento de ligação ao antígeno F(ab)'. Devido ao grupo tiol que este fragmento possui na posição oposta ao local de reconhecimento do antígeno, e às interações que ocorrem entre esse mesmo grupo e a superfície de ouro do biossensor, o fragmento F(ab)' processado, pode contribuir para a orientação do anticorpo (Lee, W. et al. 2005).

Por sua vez, os sensores que baseiam a sua detecção na *surface plasmon resonance* (SPR), são desenvolvidos para medir directamente a ligação dos analitos à superfície do sensor num meio biológico complexo, com elevada sensibilidade e relativa simplicidade, num curto espaço de tempo (Disley, D. et al. 1998; Oh, B. et al. 2003; Shakib, F. and Stanworth, D. 1980). Para se perceber o funcionamento deste biossensor, é necessário compreender o significado do termo SPR. A *surface*

ressonance descreve uma colectividade de excitações de oscilações quantificáveis dos electrões de um metal, e do campo electromagnético perto da superfície desse metal. O termo SPR destina-se a descrever o fenómeno que ocorre quando a luz é reflectida a partir dessa superfície metálica fina. O uso deste tipo de biosensores, rapidamente ganhou popularidade no campo do controlo de qualidade e na produção biofarmacêutica, sendo o sistema *Biacore* actualmente o maior sistema com tecnologia SPR disponível que apresenta uma camada metálica (50nm) de ouro a cobrir a superfície do sensor. Para que ocorra a detecção, luz polarizada é dirigida para a parte de trás da superfície do biosensor, provocando a excitação dos electrões da camada de ouro sendo o resultado, uma mudança de intensidade do ângulo da luz reflectida. Quando a amostra é injectada por um sistema de microfluidos, esta vai interagir com as moléculas que se encontram imobilizadas à superfície do sensor, e as interacções que ocorrem entre a amostra e os elementos de bioreconhecimento que vão provocar a alteração de massa na superfície do biosensor, que por sua vez provoca uma alteração no ângulo de reflexão da luz polarizável, que é directamente proporcional à massa de material ligado à superfície do biosensor, detectada e calculada em tempo real por um sensorgrama, tal como se pode observar na figura 7 (Thillaivinayagalingam, P. et al. 2010)

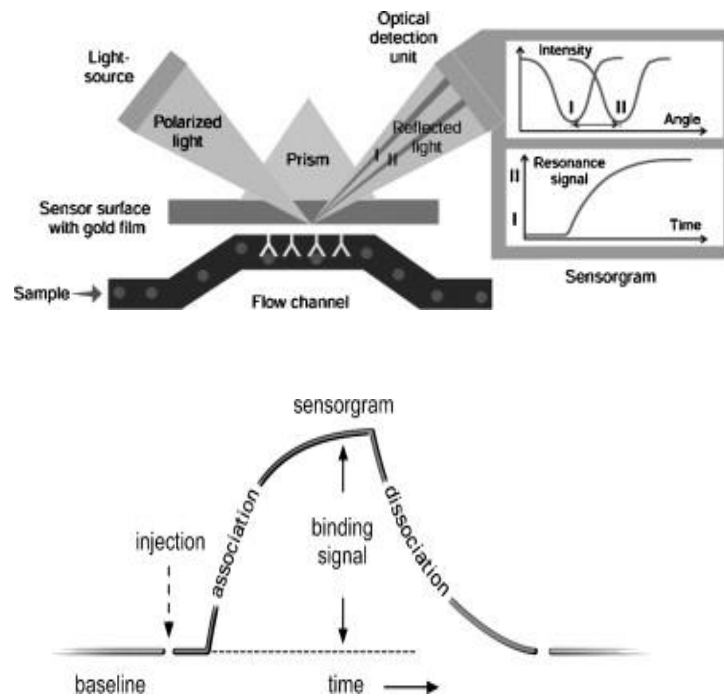


Figura 7 – Esquema de sistema de detecção de SPR (adaptado de (Thillaivinayagalingam, P. et al. 2010)

Após a detecção, um tampão de eluição é utilizado para remover o analito, provocando novamente uma alteração no ângulo de SPR, que retoma ao seu valor de

pré-exposição da superfície ao analito (Thillaivinayagalingam, P. et al. 2010). Este tipo de tecnologia, veicula assim, informação acerca da cinética da ligação do analito ao elemento de reconhecimento, e da sua dissociação, podendo ser usado para quantificar a intensidade das interações entre o analito e o elemento de reconhecimento imobilizado no sensor, podendo ser aplicado para identificar as moléculas alvo, que interagem directamente com o ligando imobilizado sob a superfície do sensor, e monitorizar a influência de outras propriedades, da solução da amostra (pH, força iónica) na capacidade de ligação e dissociação (Gutiérrez-Gallego, R. et al. 2009). Como exemplo deste tipo de tecnologia, refere-se o dispositivo de diagnóstico da infecção do vírus da dengue, no qual anticorpos IgM específicos produzidos para com o vírus são monitorizados através das interações que estabelecem com o antígeno do vírus da dengue, imobilizados na superfície do imunossensor (Kumbhat, S. et al. 2010).

3. Desenvolvimento e produção de anticorpos

O desenvolvimento e produção de anticorpos, afigura-se como um processo com desafios substanciais, particularmente no que diz respeito à criação e implementação do processo de produção. Este processo intrincado envolve não só a coordenação de um grande número de actividades, como também de um grande número de especialistas em disciplinas bastante diversas como a clínica, a toxicologia, a biotecnologia, entre outras (Steinmeyer, D. E. and McCormick, E. L. 2008).

No desenvolvimento deste processo, em muito contribuiu *Köhler* e *Milstein* com a implementação do método de produção de anticorpos monoclonais de rato. Contudo, este tipo de anticorpos apresentava algumas limitações a nível terapêutico, devido à sua imunogenicidade em humanos, situação que tem vindo a ser liquidada com o desenvolvimento da engenharia genética. Como tal, começaram por se desenvolver anticorpos quiméricos, que apresentam 66% da sua estrutura humana e 34% de rato (metade dos anticorpos terapêuticos aprovados pela FDA apresentam este desenho), seguindo-se o aparecimento de anticorpos humanizados, até se chegar ao aparecimento de anticorpos cuja estrutura é completamente humana (figura 8)(Chadd, H. and Chamow, S. 2001).

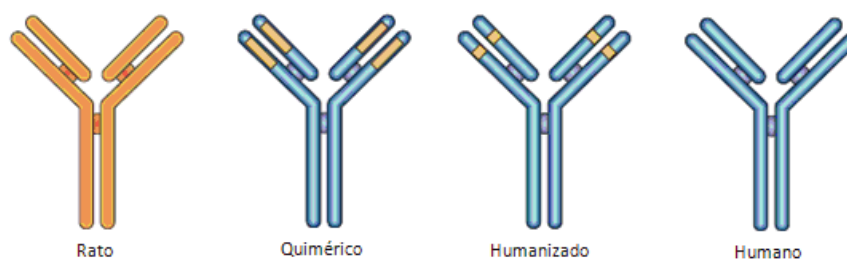


Figura 8 – Evolução no desenvolvimento de anticorpos (adaptado de Brekke, O. and Sandlie, I , 2003)

Actualmente, existem 18 anticorpos monoclonais aprovados para uso terapêutico e muitos mais a serem testados em ensaios clínicos, que na sua maioria, foram produzidos recorrendo à tecnologia de ADN recombinante, existindo também alguns anticorpos monoclonais produzidos através da técnica de hibridomas (Birch, J. and Racher, A. 2006).

Na fase de desenvolvimento de anticorpos existem dois factores importantes a ter em consideração. O primeiro prende-se com a minimização do tempo requerido para facultar material aos ensaios clínicos e o segundo está relacionado com o desenvolvimento de um processo, que ofereça uma quantidade de material suficiente, com a qualidade adequada para liquidar as exigências do mercado a um preço acessível. Na construção do processo deve considerar-se que este deve ser facilmente implementado, robusto e deve ir ao encontro dos critérios de qualidade e segurança (Birch, J. and Racher, A. 2006).

Nos processos que em que se utilizam linhas celulares para o desenvolvimento de anticorpos, estas devem ser criadas rapidamente e exibir uma elevada taxa de produtividade, para que possam ser utilizadas durante um longo período de tempo. Na escolha das linhas celulares, deve ter-se em consideração a capacidade das mesmas para produzir uma elevada concentração de anticorpo com características uniformes no sistema de produção escolhido, e a velocidade a que obtemos o produto. Actualmente, para a produção de anticorpos monoclonais utiliza-se a cultura de células de animais, sendo que podem ser encontrados anticorpos produzidos através de linhas celulares de *Chinese hamster ovary* (CHO), *murine lymphoid cells*, *murine hybridomas*. Nestes últimos, ao contrário dos hibridomas originais, as células do fígado são retiradas de um rato transgénico que possui o locus da imunoglobulina murina substituída por genes humanos. No entanto, também podemos encontrar anticorpos produzidos a partir de culturas de bactérias, leveduras, plantas transgénicas, que tal como as culturas de células animais também têm impacto nas características do produto final, bem como no nível e tipo de impurezas com as quais os investigadores têm de lidar nos subsequentes processos de purificação (Kozlowski, S. and Swann, P. 2006) (Birch, J. and Racher, A. 2006).

Actualmente, as culturas celulares modernas conseguem produzir uma concentração de anticorpo que excede os 5 g/L. Este facto deve-se às melhorias registadas a nível tecnológico, e nas consequentes optimizações do processo, sendo que a utilização de linhas celulares com as características desejadas, sistemas de expressão apropriados e um bom protocolo de transfecção e selecção, contribuem em muito para a elevada produtividade (Birch, J. and Racher, A. 2006).

A capacidade das linhas celulares para apresentarem uma elevada produtividade volumétrica prende-se com três factores. A eficiente transcrição dos genes do anticorpo, que é alcançada através da utilização de um vector de expressão apropriado, sendo os de uso mais frequentemente o *Glutamine Synthetase (GS) Gene Expression System* bem como os baseados nos *dihydrofolate reductase* (DHFR) genes. Outro factor importante a ter em conta, é a capacidade de realização de uma

eficiente tradução do mRNA do anticorpo, e por último a capacidade de alcançar uma elevada concentração de células viáveis num período de tempo aceitável (Birch, J. and Racher, A. 2006).

A quantidade de anticorpo produzida depende da finalidade de utilização do produto e do seu estado de desenvolvimento. O tipo de bioreactor, a composição do meio, a duração do tempo de cultura bem como os restantes parâmetros envolvidos influenciam a natureza do produto obtido e das impurezas relacionadas com esse produto. As quantidades de produto obtido, podem variar assim de microgramas a algumas gramas para estudos de investigação e toxicologia, até dezenas a centenas de gramas para aplicações de diagnóstico, e finalmente a alguns quilogramas a centenas de quilogramas a quando de produções licenciadas. Uma consequência das exigências da produção de anticorpos tem sido o aumento dramático das capacidades industriais e o aumento na escala dos reactores utilizados para a sua produção. Estes sistemas tornaram-se bastante sofisticados com a adição de dispositivos periféricos para as operações de alimentação e armazenamento e manutenção das condições estéreis, tanto para as células como para o produto (Carson, K. 2005).

Para as culturas em grande escala são utilizados principalmente dois tipos de sistemas: o modelo *fed-batch*, e o modelo de cultura em perfusão contínua. O modelo *fed-batch* (figura 9) é o modelo mais utilizado capaz de operar até volumes de 20000L e é abastecido com uma solução de nutrientes chave, de forma a manter uma quantidade suficiente de nutrientes durante o processo de fermentação, não havendo remoção do meio de cultura que só no final do ciclo é armazenada (Birch, J. and Racher, A. 2006).

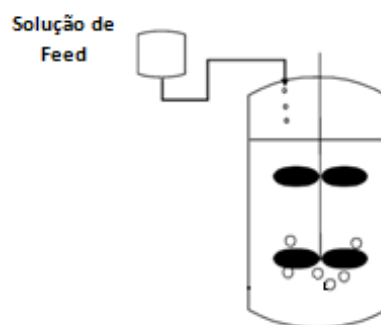


Figura 9 – Modelo *fed-batch* (adaptado Birch, J. and Racher, A. , 2006)

Por sua vez no modelo de cultura de perfusão contínua, representado na figura 10, há uma adição contínua de novo meio ao reactor, sendo que o meio que contém o produto também é removido continuamente. Alguns cientistas, afirmam que este tipo de sistema permite obter uma concentração de anticorpo 10 vezes superiores à obtida no modelo *fed-batch*. No entanto, este modelo apresenta como desvantagem um aumento de tempo de produção e de complexidade (Birch, J. and Racher, A. 2006)

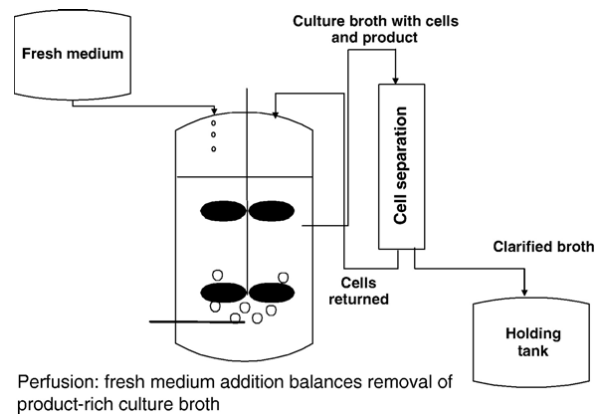


Figura 10 – Modelo de perfusão contínua (adaptado Birch, J. and Racher, A. , 2006)

De uma forma resumida, o processo tecnológico de desenvolvimento de anticorpos inclui: linhas celulares modificadas para produzir o anticorpo pretendido; procedimentos de culturas celulares para a propagação celular e para a produção da forma pretendida do anticorpo; processos para purificar o anticorpo produzido de modo a atingir os parâmetros pretendidos; por último, testes analíticos que monitorizem o processo e avaliem os passos intermédios e o produto final (Steinmeyer, D. E. and McCormick, E. L. 2008).

O esquema apresentado na figura 11 é um exemplo de uma plataforma implementada para a produção de anticorpos monoclonais, que apresenta uma linha de células que por transfecção/selecção de vectores produzem o anticorpo desejado, que posteriormente será purificado (Shukla, A. et al. 2007; Steinmeyer, D. E. and McCormick, E. L. 2008).



Figura 11 – Exemplo de processo de produção de anticorpo (adaptado de (Shukla, A. et al. 2007)

O processo de purificação do anticorpo, normalmente é constituído por múltiplas colunas cromatográficas. Cada coluna com uma função específica no processo, sendo seleccionadas com base nas características do produto. O tipo de coluna cromatográfica a utilizar, os parâmetros da coluna, o produto e as impurezas que introduzimos na mesma, bem como a composição do tampão, influenciam e determinam o processo de purificação. Este processo, não é constituído somente por passos cromatográficos, mas também por incubações a baixos valores de pH, nano-filtrações tudo concebido para eliminar ou inactivar retrovírus endógenos. Ao analisar vários processos implementados a nível industrial, verifica-se que no processo de purificação existem vários passos de filtração, incluindo passos de ultra e diafiltração. No entanto, cada um destes passos de purificação pode introduzir novas impurezas inerentes ao processo, como os filtros, os conteúdos das colunas e os componentes dos tampões utilizados. Deste modo, o processo de purificação deve ser concebido de forma a assegurar, que todas as impurezas introduzidas durante o processo são eliminadas, de modo a atingir os níveis de pureza e segurança desejados no produto final (Kozlowski, S. and Swann, P. 2006; Shukla, A. et al. 2007).

4.1 Purificação de Anticorpos

Os produtos da indústria biotecnológica são altamente diversificados (ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormonas, aminoácidos, péptidos, proteínas, anticorpos) e como resultado dessa diversidade, não existem processos de purificação de aplicação geral, sendo necessário desenvolver métodos de purificação efectivos rápidos e económicos para cada substância (Flatman, S. et al. 2007; Schmidell, W. L., U.; Aquarone, E.; Borzani, W. 2001).

De um modo geral, pode dizer-se que os métodos de purificação de anticorpos podem dividir-se em: métodos de precipitação e métodos cromatográficos, sendo que os métodos cromatográficos podem ainda subdividir-se consoante as características operacionais que possuem. Dependendo da aplicação do anticorpo, assim será requerido um determinado grau de pureza e deste modo escolhida uma determinada estratégia de purificação, sendo que muitas das estratégias actualmente implementadas são constituídas por múltiplos passos cromatográficos de modo a obter o grau de pureza exigido. No entanto, como cada anticorpo é único, e cada um tem um determinado tamanho, uma distribuição hidrofóbica própria, características de carga positiva e negativa, são necessárias modificações no processo de purificação (Josic, D. and Lim, Y. 2001).

No presente trabalho, pretende-se desenvolver um procedimento, que permita alcançar o grau de pureza desejado, recorrendo à utilização de técnicas cromatográficas. Um dos métodos cromatográficos utilizados para a purificação de anticorpos é a cromatografia de afinidade, que explora as características de afinidade que matrizes de proteína A, proteína G, ligandos biomiméticos e antigénios imobilizados apresentam para com o anticorpo. A cromatografia de troca iónica, a cromatografia de hidroxapatite, a cromatografia de interacção hidrofóbica e a cromatografia de exclusão molecular, podem ser igualmente aplicadas na purificação de anticorpos.

4.1. 1 Aspectos gerais da técnica cromatográfica

A cromatografia, é provavelmente a técnica com maior versatilidade, sendo a mais poderosa ao dispor dos analistas. Num único passo, pode separar os componentes presentes numa mistura e simultaneamente fornecer uma estimativa quantitativa acerca de cada constituinte.

O reconhecimento da cromatografia como um método de separação eficiente, decorreu com o botânico russo Tswett, que utilizou uma simples cromatografia liquido-sólido, para separar os pigmentos de plantas. A coloração das bandas obtidas no adsorvente evocou o termo “cromatografia” para esta técnica de separação. Apesar de a “cor” ter pouco a ver com a cromatografia moderna, o nome persistiu, e mesmo sendo irrelevante, é usado em todas as técnicas que empreguem os requisitos essenciais para a separação cromatográfica, isto é, uma fase móvel e uma fase estacionária (Scott, R. 2003).

De acordo com a *International Union Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, a cromatografia é um método de separação, em que os componentes se distribuem entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. A fase estacionária pode ser empacotada numa coluna, espalhada em camada ou distribuída como um filme. Por sua vez, a fase móvel pode ser líquida ou gasosa. Pode dizer-se, que esta técnica explora os diferentes tipos de interações, (hidrofóbicas, electroestáticas, afinidade, entre outras), entre os solutos, as fases móveis e estacionárias, permitindo assim a existência de diferentes técnicas cromatográficas, como se pode observar na tabela 4 e na figura 12.

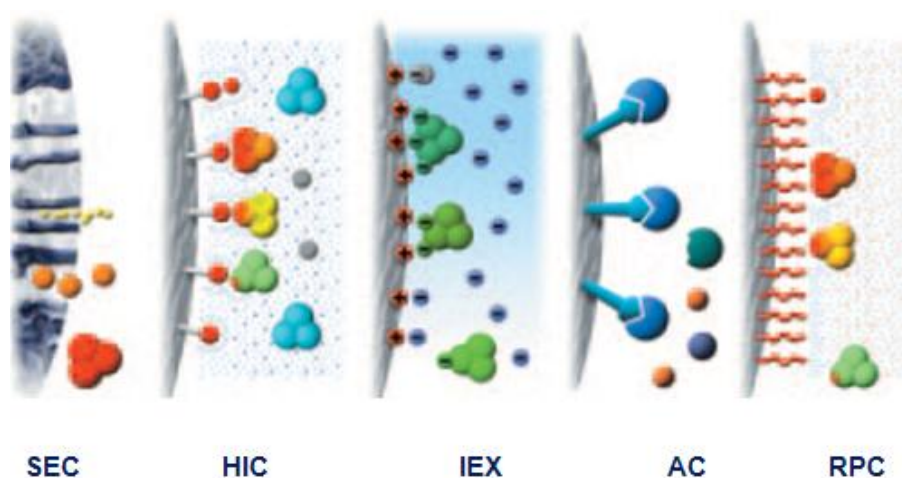


Figura 12 – Diferentes tipos de interações e subsequentes técnicas cromatográficas (adaptado de Biosciences, A.)

Tabela 4 – Interações e respectivos sistemas cromatográficos (adaptado de Biosciences, A.)

Tipo de interações	Sistema cromatográfico
Tamanho	Cromatografia de exclusão molecular (SEC), também designada por filtração em gel (GF)
Carga	Cromatografia de troca iónica (IEX)
Hidrofobicidade	Cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC), Cromatografia de fase reversa (RPC)
Bioreconhecimento	Cromatografia de afinidade (AC)

Dependendo do grau de afinidade entre os diferentes solutos e as duas fases, assim teremos uma determinada magnitude de interacção, sendo que os solutos que interagem preferencialmente com a fase estacionária, apresentam um maior tempo de retenção no sistema em relação aos que se encontram distribuídos selectivamente na fase móvel. Como consequência, os diferentes solutos interagem com intensidades distintas, apresentando diferentes coeficientes de distribuição, percorrendo o sistema com diferentes velocidades, sendo deste modo alcançada a separação (Scott, R. 2003).

De uma maneira geral, um sistema cromatográfico é constituído por uma coluna, um sistema de injeção, bombas, detectores, registador/computador e um colector de fracções.

A coluna, não é mais que um empacotamento de partículas de interesse, as quais são revestidas ou se ligam à fase estacionária, que sujeita à passagem de fase móvel sob uma determinada pressão, permite a eluição dos componentes da amostra injectada. O seu desenho permite a separação das biomoléculas com base nos tipos de interacção existentes entre as moléculas e as fases, tal como se pode observar na figura 13.

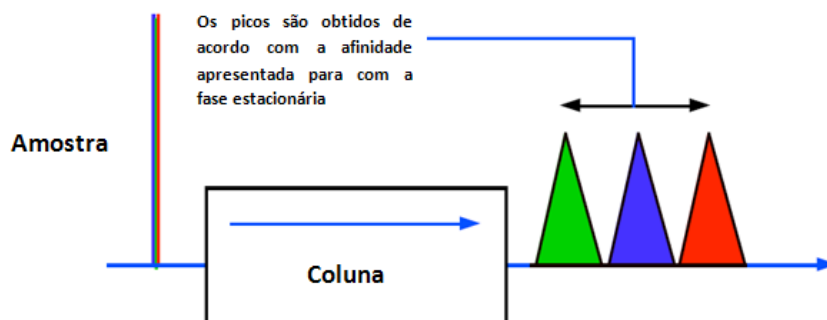


Figura 13 – Esquema representativo do processo de separação de uma amostra por meio da utilização da técnica cromatográfica

O modo de operação típico do sistema cromatográfico consiste em: primeiro equilibrar as fases de forma a promover o ajuste do sistema às condições de ligação; seguidamente a amostra é injectada na corrente da fase móvel passando através da coluna. O componente que apresente menores interações com a fase estacionária, elui em primeiro lugar. Em contra partida, o que apresente uma interacção mais intensa, elui em último. A terceira etapa do processo, é a lavagem e remoção de todo o material não ligado à fase estacionária, seguindo-se a eluição da biomolécula de interesse, e posterior regeneração e limpeza do sistema

4.2 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é frequentemente utilizada para a purificação de diferentes macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos (Ninfa, A. B., D.; Benore, M. 2010). Este tipo de cromatografia usa ligandos bioespecíficos para isolar e/ou purificar uma proteína por adsorção selectiva e desorção. Os ligandos são normalmente ligados covalentemente a um suporte sólido, por exemplo agarose, sendo que os ligandos utilizados podem ser compostos de peso molecular elevado como inibidores de enzimas, e compostos de baixo peso molecular, como análogos de substrato (Lima, N. M., M. 2003).

Com a introdução da proteína A para a purificação de IgG em 1972 por Hjelm (Hjelm, H. and Hjelm, K. 1972) e Kronvall (Kronvall, G. 1973), este método de purificação de anticorpos tornou-se bastante popular. A proteína como componente da parede do *Staphylococcus aureus* liga a porção Fc da imunoglobulina IgG especificamente, permitindo uma simples separação cromatográfica, com ou sem a utilização de instrumentos sofisticados. Neste processo cromatográfico, a maioria dos anticorpos são eluídos com recurso à utilização de um gradiente a baixos valores de pH, como por exemplo 0,1M de tampão citrato a pH 2,4. A cromatografia de afinidade com base na proteína A é capaz de oferecer um rendimento de pureza superior a 95%, num único passo. Contudo, anticorpos não específicos provenientes do hospedeiro, também se ligam à proteína A, sendo co-eluídos com o anticorpo alvo. De forma a minimizar esta desvantagem, têm sido estudados outros ligandos como é o caso da proteína G e dos ligandos biomiméticos (Josic, D. and Lim, Y. 2001; Low, D. et al. 2007; Shukla, A. et al. 2007).

Uma das principais limitações desta técnica cromatográfica, para além do elevado custo da resina, advém da desnaturação dos anticorpos que se manifesta através da formação de agregados, fragmentações e perda da actividade biológica devido às condições necessárias para a eluição (Josic, D. and Lim, Y. 2001).

4.3. Cromatografia de troca iónica

A cromatografia de troca iónica (IEC), tendo vindo a ser utilizada ao longo dos anos para a purificação de anticorpos (Svasti, J. and Milstein, C. 1972). Nesta técnica, ao contrário da filtração em gel, existe uma interacção entre a biomolécula e o suporte insolúvel, sendo a força de ligação que se estabelece entre a biomolécula e o suporte determinada pela força iónica da fase móvel e pelo número de interacções entre os grupos iónicos da molécula e do suporte. A eluição é conseguida através da aplicação de um gradiente de força iónica, de pH ou de ambos. Uma vez que os anticorpos, possuem um ponto isoeléctrico mais baixo que as restantes proteínas contaminantes, a IEC constitui-se um método de purificação útil. Pelo facto, de cada anticorpo apresentar características únicas com variações no seu ponto isoeléctrico, a ligação dos anticorpos à resina da IEC necessita de ser explorada e determinada com base nas características individuais. Alterações do pH utilizados podem resultar em alterações do perfil cromatográfico dos contaminantes permitindo deste modo uma co-

eluição dos mesmos com o anticorpo alvo, e para que tal não aconteça, é necessário um estudo do valor de pH para a realização de uma óptima separação. Contudo, esta técnica não permite realizar a separação do anticorpo num único passo (Josic, D. and Lim, Y. 2001; Lima, N. M., M. 2003; Schmidell, W. L., U.; Aquarone, E.; Borzani, W. 2001).

4.4 Cromatografia de interacção hidrofóbica

A cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC), tem como fundamento de separação a adsorção de biomoléculas a grupos hidrofóbicos, como o grupo fenil e o grupo butil que se encontram covalentemente ligados à matriz hidrofílica da HIC. Como os anticorpos são biomoléculas que apresentam um maior grau de hidrofobicidade que os seus contaminantes, a HIC constitui-se como uma técnica efectiva para a purificação de anticorpos (Deisenhofer, J. 1981). A adsorção dos anticorpos à matriz da HIC é alcançada pela presença de uma elevada concentração de sal, sendo que a escolha do sal e da concentração a utilizar, vai afectar a selectividade da ligação do anticorpo para com a matriz (Helm, C. et al. 1989). A eluição dos anticorpos é conseguida por um decréscimo da força iónica e/ou da adição de competidores hidrofóbicos, como os solventes orgânicos, através da utilização de um gradiente linear. A adição de solventes orgânicos na fase móvel promove um aumento da quantidade de anticorpo recuperado aumentando também o risco de desnaturação. Os ligandos de fenil têm sido utilizados com sucesso para a purificação de anticorpos monoclonais, uma vez que a concentração de sal necessária para o processo encontra-se abaixo do nível a que ocorre a precipitação dos anticorpos (Gagnon, P. et al. 1995). De uma forma geral, a HIC é extremamente útil para a purificação de anticorpos de todas as classes e subclasses, sendo especialmente atractiva uma vez que remove os contaminantes que se apresentam de difícil remoção para as técnicas de SEC, IEC, removendo entre 50-75% dos anticorpos não específicos presentes na amostra inicial (Josic, D. and Lim, Y. 2001).

4.5 Cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel

A cromatografia de exclusão molecular (SEC), devido à sua simplicidade é um método muito popular para uma escala de purificação de anticorpos a nível laboratorial, sendo a técnica escolhida na realização deste trabalho experimental. Esta técnica promove a separação das biomoléculas, com base nas diferenças de tamanho que estas apresentam, não havendo uma interacção destas com o gel da coluna da SEC (figura 14), que não é mais que uma matriz porosa com forma de partículas esféricas, escolhidas pela sua estabilidade química e física, e por ser inerte, isto é, não apresentar reactividade ou propriedades de adsorção (Josic, D. and Lim, Y. 2001; Lima, N. M., M. 2003).

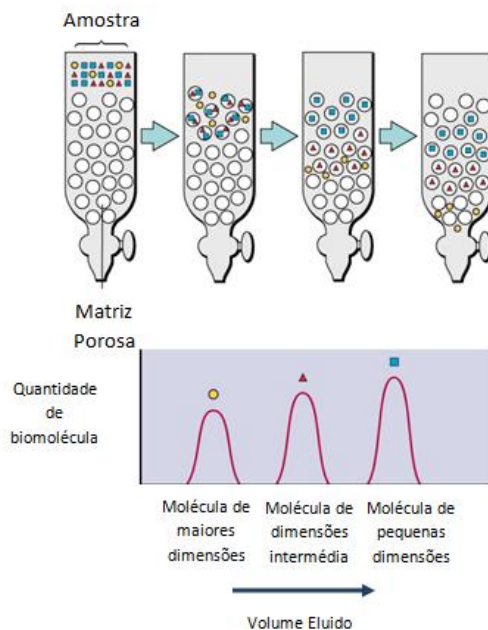


Figura 14 – Esquema representativo do processo de cromatografia de exclusão molecular (adaptado de www.bio.miami.edu, 2010)

Ao contrário da cromatografia de troca iónica ou de afinidade, nesta técnica as moléculas não se ligam ao meio cromatográfico, sendo por este motivo que a composição do tampão não influencia directamente a resolução (grau de separação entre os picos) do cromatograma. Assim, as condições de ensaio da filtração em gel podem ser adaptadas consoante o tipo de amostra, ou os requisitos para futuras purificações, análise ou armazenamento sem alterar as condições de separação, não

sendo necessária a utilização de um método muito elaborado. Os componentes da amostra nesta técnica são eluídos isocraticamente, isto é, não é necessário à utilização de diferentes soluções tampão para a separação, porque após a selecção do meio de filtração em gel, o volume da amostra e as dimensões da coluna são os pontos de maior relevância no que diz respeito aos componentes que afectam a resolução da separação (Lima, N. M., M. 2003).

A sua maior limitação, é a baixa resolução, baixa capacidade e maior tempo para a realização do ensaio. No entanto, e uma vez que a separação por esta técnica é realizado através da utilização de condições não drásticas, podendo ser realizada tanto a temperaturas de 37°C, como em salas frias, mantêm os anticorpos a sua actividade biológica, ao contrário de outros métodos, em que se requer uma exposição a pH extremos, elevadas concentrações de sal ou agentes caotrópicos, a SEC alcança um grau de pureza entre 50 e 80% para as IgG (Josic, D. and Lim, Y. 2001).

Nesta técnica é importante que o anticorpo se encontre completamente solubilizado sob as condições do tampão, que deve apresentar uma concentração de sal relativamente moderada, uma vez as IgG são fracamente solúveis em tampões com baixa força iónica. Por sua vez, a utilização de elevadas concentrações de sal ou de aditivos orgânicos como o polietileno glicol no tampão, pode também alterar a performance de separação da SEC. Tal como o sal, a glicina possui um efeito solubilizante sob os anticorpos, sendo um aditivo recomendado a utilizar no tampão da SEC. Contudo, esta técnica não permite distinguir entre o anticorpo monoclonal específico e os anticorpos contaminantes não específicos da mesma classe (Josic, D. and Lim, Y. 2001).

5. Objectivos

O presente trabalho tem como principal objectivo a purificação de diferentes fragmentos de anticorpos para posterior aplicação em testes de diagnóstico. Para tal, foram definidas as seguintes tarefas:

1 Implementação do processo desenvolvido no sistema de cromatografia líquida Äkta Purifier;

2. Purificação dos diferentes fragmentos de anticorpo $F(ab)'_2$ por cromatografia preparativa de exclusão molecular;

3. Caracterização dos fragmentos de anticorpos;

II. Materiais e Métodos

2.1 Material

A água ultra-pura utilizada no sistema de cromatografia líquida *Äkta Purifier* foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore/Waters). O fosfato de potássio, o ácido etilenamino tetra-acético (EDTA) foram obtidos através da Sigma. O citrato de sódio foi obtido pela Alrich. O cloreto de sódio, por sua vez foi obtido pela Panreac, enquanto o ácido cítrico foi obtido pela Merck. Todos os tampões, foram preparados com água ultra-pura obtida através da unidade de purificação de água Millipore.

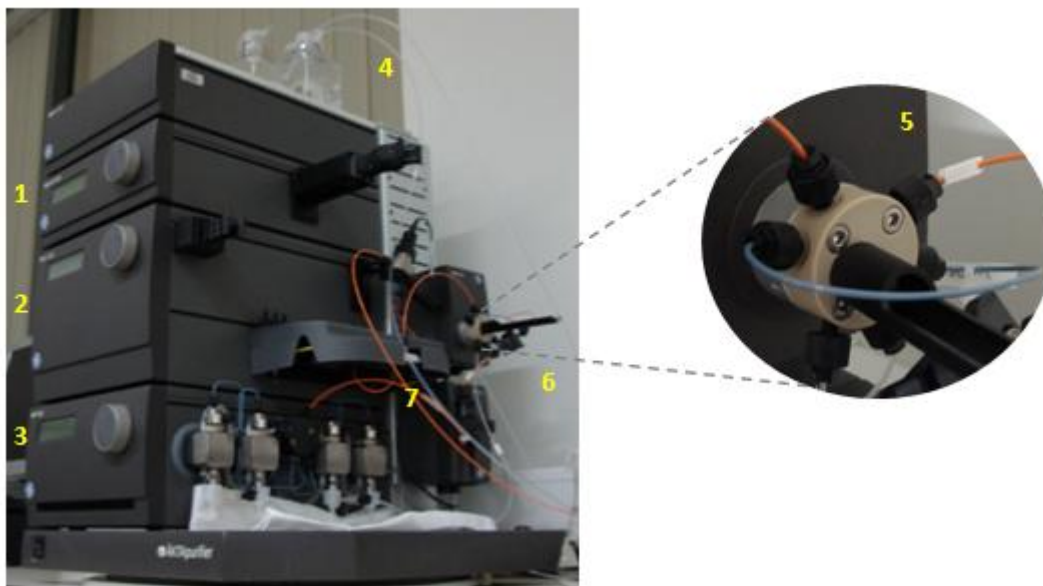
2.1.1 Anticorpos monoclonais

No desenvolvimento deste trabalho experimental foram estudados três anticorpos monoclonais da classe de imunoglobulinas IgG1: o *monoclonal anti-human C-reactive protein* (Anti-CRP), o *monoclonal anti-egg-white avidin* (Anti-Avidin) e o *monoclonal mouse anti-prostate specific antigen* (Anti-PSA). Os seus antígenos específicos são, respectivamente, a proteína sérica *C-reactive protein*, a proteína *avidin* e o antígeno específico da próstata. Os hibridomas que segregaram estes mAbs foram produzidos pela empresa *Hy Test*, por hibridação de células do mieloma com células de rato imunizado com o antígeno.

Com base nos diferentes *data sheet's* dos anticorpos monoclonais, sabe-se que o anticorpo monoclonal Anti-CRP, foi purificado através de uma coluna cromatográfica empacotada com a matriz de Proteína A-Sepharose, apresentando-se o anticorpo diluído em PBS a pH 7,4 e em 0,1% de azida (NaNO_3). Por sua vez, o anticorpo monoclonal anti-Avidin, foi purificado através de cromatografia de troca iónica, apresentando-se o anticorpo, também diluído em PBS a pH 7,4 e em 0,1% de azida (NaNO_3) enquanto que, o anticorpo monoclonal Anti-PSA que também foi purificado por cromatografia de troca iónica se encontrava diluído em 0,15 M de NaCl, 10mM Tris a pH 7,5 e em 0,05% de azida (NaNO_3). Todos os anticorpos monoclonais foram armazenados a uma temperatura de 4°C.

2.1.2 Equipamento

O sistema cromatográfico *Äkta Purifier* (figura 15), foi o instrumento utilizado para a realização deste trabalho. Como sistema de cromatografia líquida, foi desenhado de modo a oferecer resultados fiáveis das separações das diferentes biomoléculas. Capaz de suportar todas as técnicas cromatográficas, consegue trabalhar com amostras na ordem dos μg a mg a caudais que vão de 0,001 a 10ml/min com um registo de variação de pressões na ordem dos 0 a 25 MPa, ou alternativamente, trabalhar a caudais de 0,01 a 100ml/min com um registo de valores de pressões na ordem dos 0 a 10MPa. Deste modo, permite a optimização de condições de ligação e eluição, pH, gradientes bem como os caudais a utilizar. Possibilita assim, a realização das técnicas de cromatografia preparativa bem como da cromatografia analítica necessárias à realização deste trabalho.



1-Monitor de pH/Cond – 900; 2- Monitor UV – 900; 3- *Pump* P-903; 4- Fases móveis;
5- Válvula de injeção; 6- Filtro; 7- Detector

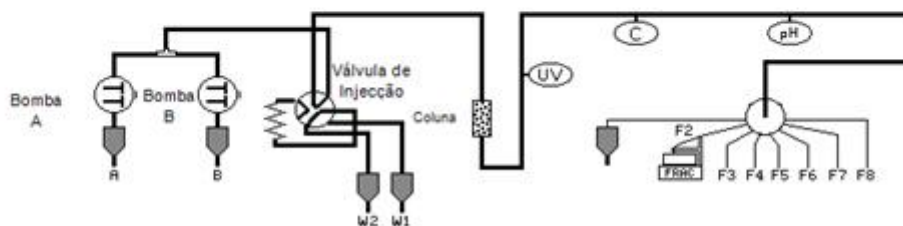


Figura 15 – Sistema de cromatografia líquida *Äkta Purifier*

2.2 Estudos de Cromatografia de Exclusão Molecular ou Filtração em Gel

A cromatografia de exclusão molecular permite a separação dos diferentes componentes da amostra com base nas diferenças de tamanho das biomoléculas, tendo sido aplicada esta técnica tanto na realização da cromatografia analítica, como na realização da cromatografia preparativa.

Todas as separações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente no sistema de cromatografia líquida *Äkta Purifier*, sendo que os tampões utilizados foram previamente filtrados e desgaseificados.

2.2.1 Cromatografia Analítica

Para a realização da técnica de cromatografia analítica recorreu-se à utilização da coluna de filtração em gel, Superdex 200 PC 3.2/30 cuja matriz é constituída por um compósito de ligações cruzadas de agarose e dextrano, de dimensões: 3,2mm i.d. x300 mm, de modo a quantificar e identificar os componentes da amostra a analisar (Anticorpos, Fragmentos de Anticorpos $F(ab)'_2$ e $F(ab)'$). Para tal, a coluna é equilibrada com o tampão PBS-EDTA, constituído por: 100mM de fosfato de potássio, 150mM de cloreto de sódio e 10mM de EDTA a pH 6,9, recorrendo a valores de caudais que vão de 0,01 a 0,1mL/min (caudal máximo suportado pela coluna) com um registo de pressões que varia de 0,28 a 1 MPa, facto a ter em consideração durante o processo, uma vez que o limite máximo de pressão da coluna é de 1,5MPa.

Após a fase de equilíbrio da coluna, as amostras são injectadas num loop de 10 μ L ou 20 μ L, com o auxílio de uma seringa de 250 μ L da *Hamilton*. O processo de eluição é monitorizado a um valor de absorvância de 280nm e realizado com a utilização do mesmo tampão PB-EDTA a pH 6,9, demorando um período de aproximadamente 30min. No final da utilização da coluna, esta, é lavada com água e posteriormente com uma solução de etanol a 20%.

2.2.2 Cromatografia Preparativa

A realização desta técnica permite purificar o fragmento $F(ab)'_2$ resultante do processo de fragmentação do anticorpo. A técnica de cromatografia preparativa, foi realizada numa coluna empacotada com a matriz Superose de dimensões 0,8cm i.d. x 95cm. Antes de cada estudo a coluna é equilibrada com o tampão salino constituído por: 100mM de fosfato de potássio e 150mM de cloreto de sódio, a pH 6,9. Após a fase de equilíbrio da coluna, o resultado da reacção de fragmentação, que contém o fragmento $F(ab)'_2$ é injectado no topo da mesma, com um volume aproximado de 200 μ L, sendo utilizado para a eluição o mesmo tampão que o utilizado na a fase de equilíbrio. Em todo o processo de eluição a absorvância foi monitorizada a 280nm, sendo aplicado um caudal de 1mL/min ao qual se encontraram associados um registo de variações de pressão entre 0,50- 0,60MPa. As fracções recolhidas durante o processo são posteriormente concentrados e analisadas por cromatografia analítica.

2.3 Fragmentação

Para estudar os fragmentos de anticorpo, é necessário proceder à fragmentação do mesmo de forma a obter a região de interesse, isto é, a região de ligação ao antigénio, o fragmento $F(ab)'_2$. Para tal, efectua-se num *ependorf* uma mistura que irá conter o anticorpo inteiro e a enzima que promoverá a clivagem do anticorpo, dissolvidos em tampão citrato. As concentrações de todos estes componentes, foram optimizadas pela empresa Biosurfit, de forma a obter o fragmento $F(ab)'_2$. Também o tempo de fragmentação bem como a temperatura a que se processa a reacção de fragmentação, foram optimizados de acordo com os componentes que constituem a mistura reaccional.

2.4. Construção da recta de calibração

De forma a perceber-se o comportamento do fragmento $F(ab)'_2$, relacionando as concentrações dos diferentes padrões de $F(ab)'_2$, com a área e altura de pico obtidas para o fragmento $F(ab)'_2$, realizou-se a construção de uma recta de calibração, (figura 16 e 17). Para tal, foram criados diferentes padrões de $F(ab)'_2$ com concentrações crescentes (0,025; 0,05; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1mg/ml), e injectados na coluna Superdex 200 PC 3.2/30, da cromatografia analítica, sendo sujeitos às mesmas condições de ensaio, realizando-se para cada valor de concentração três réplicas de forma a minimizar o erro inerente.

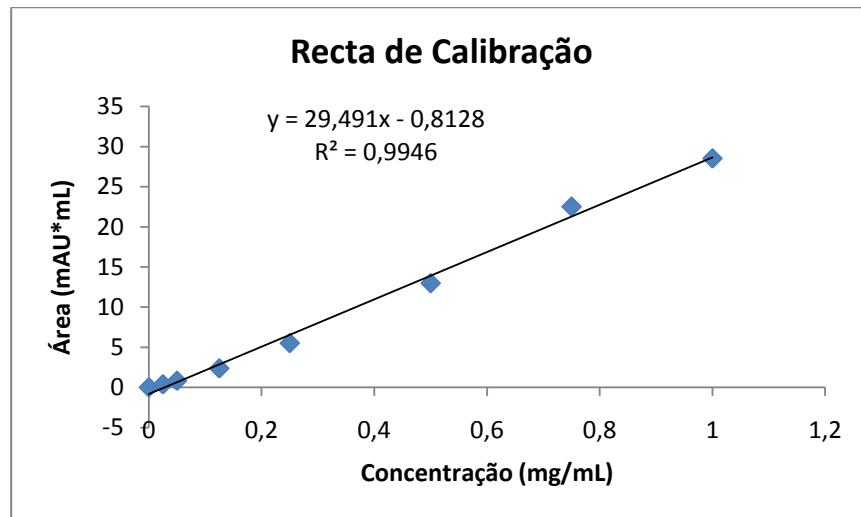


Figura 16 – Recta de Calibração de área vs concentração de $F(ab)'_2$

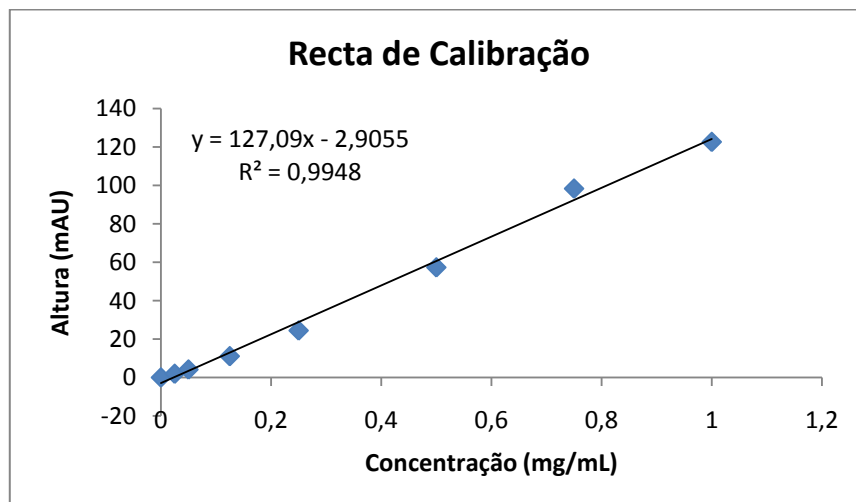


Figura 17 – Recta de Calibração de altura vs concentração de $F(ab)'_2$

2.5 Redução e Diálise

Para obter o fragmento $F(ab)'$ é necessário recorrer à redução do fragmento $F(ab)'_2$ por meio de um agente redutor que irá clivar a ligação dissulfureto que se estabelece entre as cadeias do fragmento $F(ab)'_2$.

Deste modo, para que ocorra redução é necessário criar num eppendorf uma mistura que contenha o fragmento $F(ab)'_2$ e o agente redutor dissolvidos em PBS-EDTA. As concentrações dos componentes que constituem a mistura, foram optimizadas para a realização da redução, que ocorre a uma temperatura adequada durante um determinado período de tempo t .

Após o processo de redução é necessário realizar a diálise da mistura reaccional, de forma a eliminar as impurezas inerentes ao processo de redução (ver figura 18)

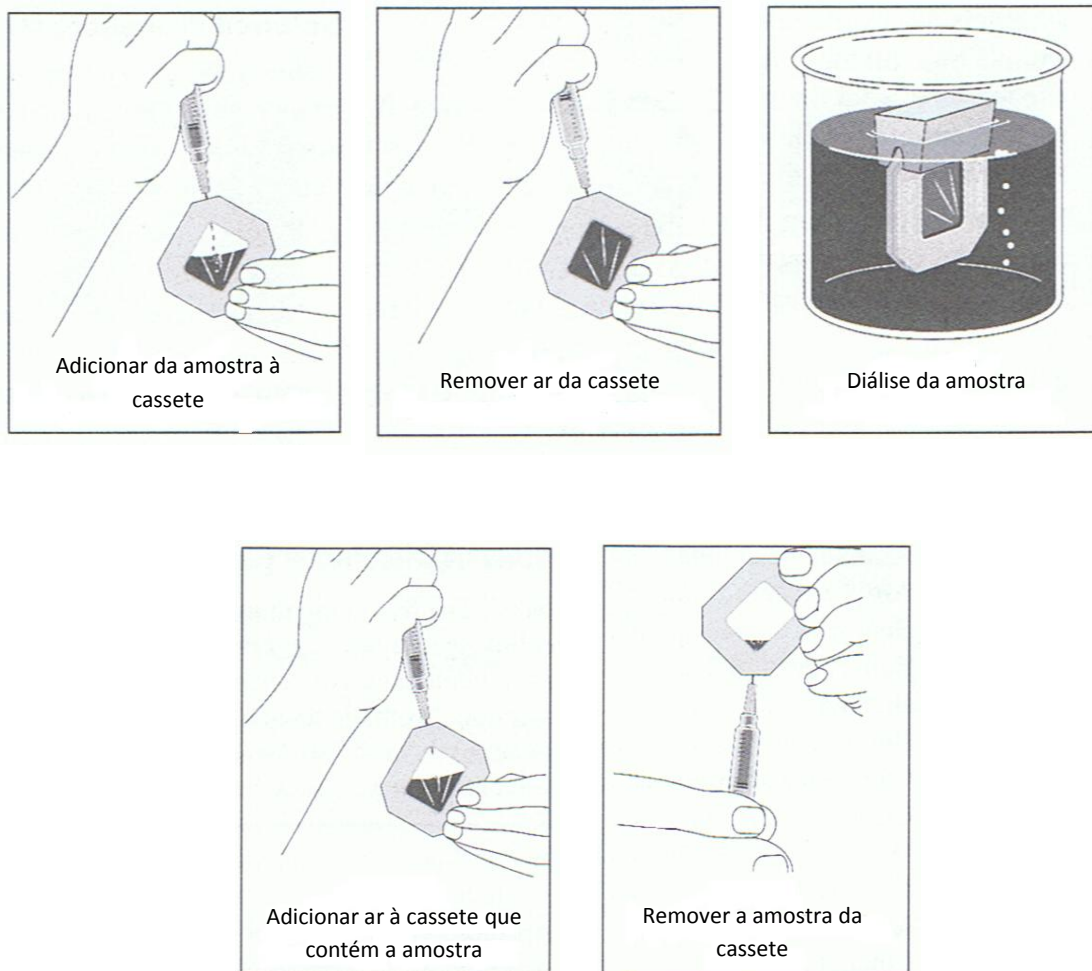


Figura 18 – Imagens ilustrativas do processo de diálise (adaptado de *Thermo Scientific Instructions*, 2010)

Para tal, tal como se pode observar na figura, coloca-se a mistura a dialisar em cassetes Slide-A-Lyser 7K, com uma capacidade volumétrica entre 0,1 a 0,5 mL e um membrane molecular-weight cutoff (MWCO) de 7,000, contra a solução tampão de PBS-EDTA com agitação. A diálise é realizada durante um período de tempo 2 vezes superior ao utilizado no processo de redução, sendo posteriormente retirada a mistura da casete de diálise.

III. Resultados e Discussão

3.1 Diagrama global do processo

O presente trabalho foi delineado em sequência do protocolo de parceria celebrado entre o Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Universidade da Beira Interior (UBI) e a empresa Biosurfit, S.A. (Lisboa, Portugal), de forma a otimizar o processo de purificação dos fragmentos: $F(ab)'_2$ e $F(ab)'$, provenientes do anticorpo Anti-CRP, Anti-Avidin e Anti-PSA. Assim, a ordem do trabalho foi orientada segundo o esquema geral representado na figura 19.

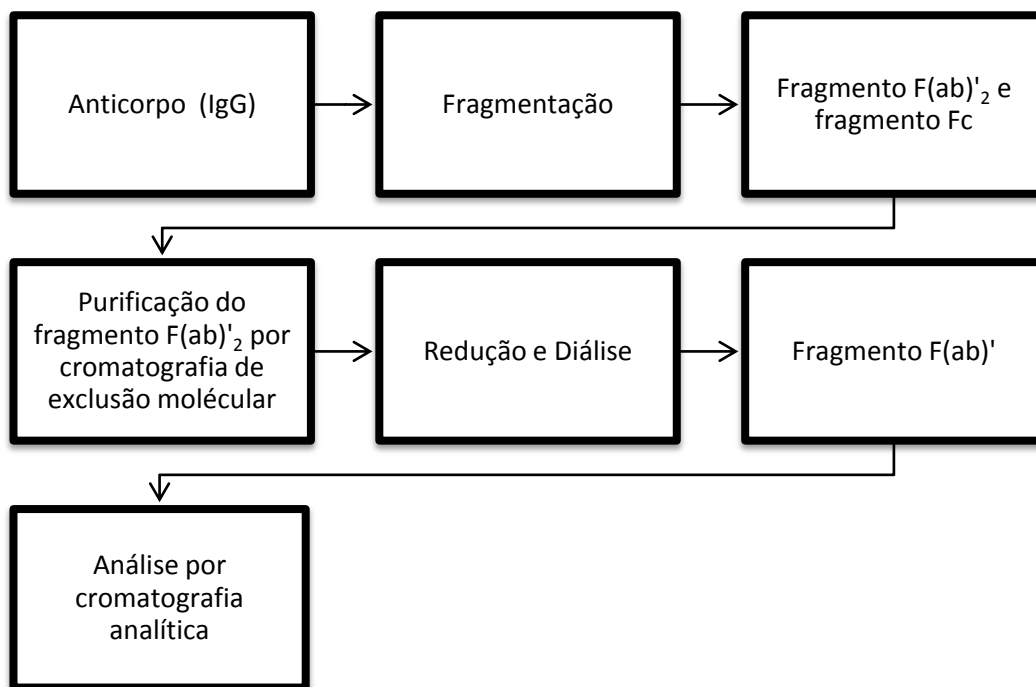


Figura 19 – Diagrama global do processo

Tanto na etapa de purificação do fragmento $F(ab)'_2$, como nas consequentes análises do grau de pureza e integridade do anticorpo por cromatografia analítica, foi utilizado o instrumento de cromatografia líquida Äkta Purifier. Tendo por base uma visão geral do processo, segue-se o desenvolvimento e discussão de forma pormenorizada das etapas desenvolvidas para cada anticorpo, sendo que para a purificação do fragmento $F(ab)'_2$ utilizou-se como fase móvel um tampão de fosfato de potássio e cloreto de sódio, enquanto para a análise do grau de pureza de cada

anticorpo foi utilizada com fase móvel o tampão PBS-EDTA a pH 6,9 escolhido por apresentar a menor interferência no perfil cromatográfico, factor importante para as subsequentes análises cromatográficas dos diferentes anticorpos e fragmentos de anticorpos, sendo monitorizada a um valor de absorvência de 280nm, como se pode observar na figura 20.

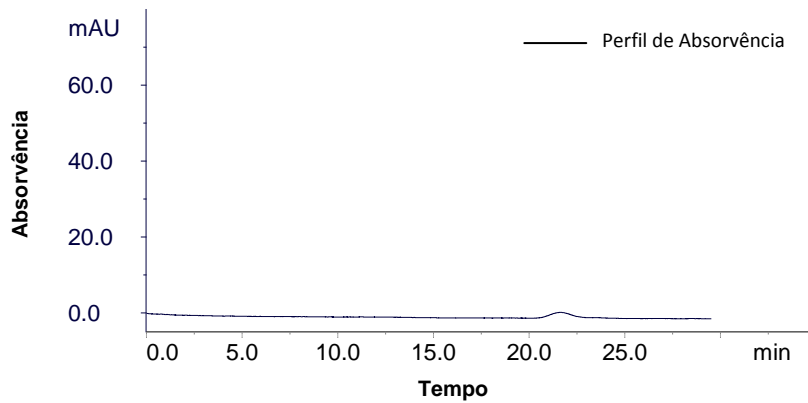


Figura 20 – Perfil cromatográfico da fase móvel PBS-EDTA a pH6,9

3.2 Estudos do anticorpo Anti-CRP

O anticorpo monoclonal Anti-CRP foi desenvolvido para interagir com a proteína sérica *C-reactive protein* (CRP), produzida no fígado. Esta proteína, pensa-se que está envolvida no processo inflamatório, uma vez que durante as inflamações bacterianas, virais e outro tipo de infecções, bem como em doenças não infecciosas, como é o caso da doença reumática, encontra-se em elevada concentração no sangue humano (Rosenau, B. et al. 2008)

3.2.1 Fragmentação do anticorpo Anti-CRP

O processo de fragmentação do anticorpo têm por objectivo, dividir a biomolécula, através da utilização de uma enzima que promove a clivagem do anticorpo de forma a obter a região de ligação ao antígeno, fragmento $F(ab)'_2$ (região de interesse) e do fragmento cristalizável Fc. Com o intuito, de controlar o processo é necessário primeiro proceder à caracterização do anticorpo inteiro e do fragmento $F(ab)'_2$ puro. Recorre-se à utilização da técnica de cromatografia analítica de filtração em gel, obtendo-se como resultado os perfis cromatográficos que se encontram na figura 21.

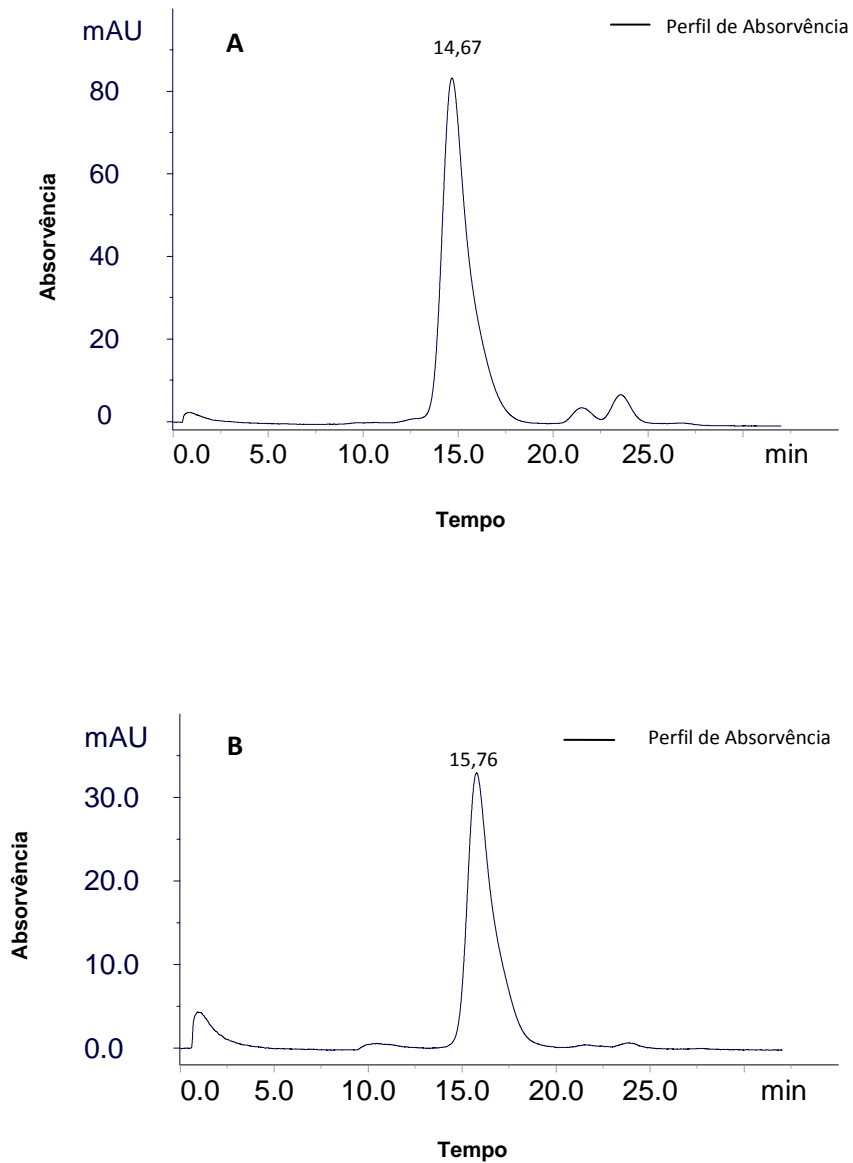


Figura 21 – Estudo do comportamento do anticorpo Anti-CRP e do fragmento $F(ab)'_2$ puro. A- Anticorpo Anti-CRP; B- $F(ab)'_2$ Anti-CRP

Uma vez, que a técnica cromatográfica SEC, promove a separação das biomoléculas com base na diferença de tamanho, tal como era de se esperar a molécula de maiores dimensão, neste caso o anticorpo inteiro que possui um peso aproximado de 150 KDa, foi eluído em primeiro lugar apresentando um menor tempo de retenção, de 14,67 min, enquanto que o fragmento $F(ab)'_2$, de peso molecular de 118 KDa, é retardada, apresentando um tempo de retenção de 15,76 min.

3.2.2 Purificação do fragmento F(ab)₂

De forma a purificar o fragmento F(ab)₂, sem comprometer a estrutura e actividade biológica do fragmento, utilizou-se a técnica de SEC, tendo sido obtidos os resultados que se encontram representados na figura 22.

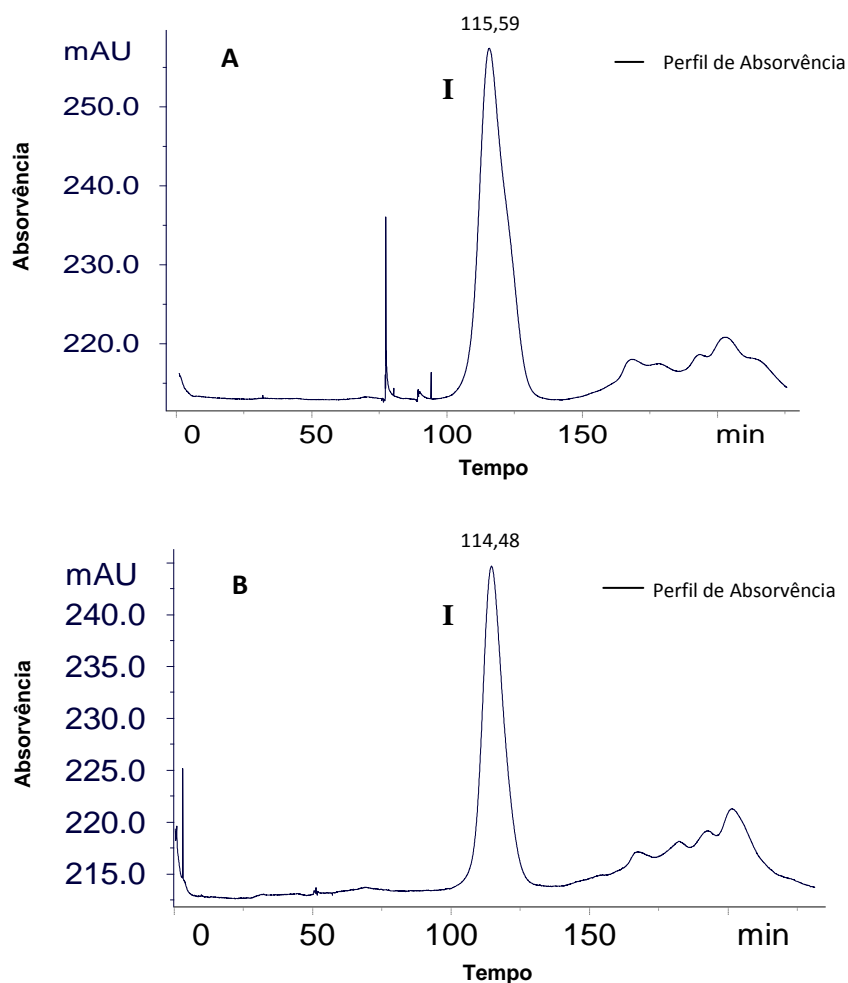


Figura 22 – Perfil cromatográfico do fragmento F(Ab)₂ por exclusão molecular. A- Cromatograma resultante da análise da mistura da fragmentação do anticorpo Anti-CRP; b) Cromatograma resultante da análise da mistura reaccional da fragmentação do anticorpo Anti-CRP com a adição de de Tris-HCl a pH 7,5

Tabela 5 – Tempos de retenção, área e altura dos cromatogramas apresentados na figura 22

Cromatograma	Picos	Tempo de retenção (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)
A	I	115,59	527,4114	44,459
B	I	114,48	283,9502	30,966

Com base nas características da técnica cromatográfica SEC, sabe-se que o primeiro pico dos perfis cromatográficos representados na figura 22, irá corresponder à molécula de maiores dimensões, que neste caso é o fragmento $F(ab)'_2$, de peso molecular de 118 KDa, sendo este o primeiro componente a eluir, com um tempo de retenção aproximado de 115 minutos, seguindo-se a eluição dos restantes componentes da mistura da reacção de fragmentação.

De forma a estudar as consequências da inibição da enzima após o processo de fragmentação no rendimento de purificação do fragmento $F(ab)'_2$, foi realizado um estudo com a adição da solução Tris-HCl a pH 7,5 à mistura reaccional. Esta solução tampão, vai promover uma mudança do pH da mistura e inactivar assim a enzima, resultando no perfil cromatográfico que se observa na figura 26 B. Por comparação com o cromatograma obtido na figura 22 A e respectivos valores de área e altura de pico, verifica-se que o fragmento $F(ab)'_2$ que resulta da reacção de fragmentação com consequente adição da solução Tris-HCl apresenta uma diminuição no valor de área e altura de pico correspondente ao fragmento $F(ab)'_2$ (Tabela 5). Complementarmente observa-se uma ligeira diminuição do tempo de retenção, facto que se deve à inibição de a actividade da enzima, o que conduz a que o anticorpo só seja sujeito ao processo de fragmentação durante o período de tempo optimizado para o processo.

As fracções recolhidas por esta técnica foram posteriormente analisadas por cromatografia analítica de exclusão molecular, com utilização da coluna Superdex 200 PC 3.2/30, obtendo-se os perfis cromatográficos, tempos de retenção, área e altura de pico, que se encontram representados na figura 23 e na tabela 6.

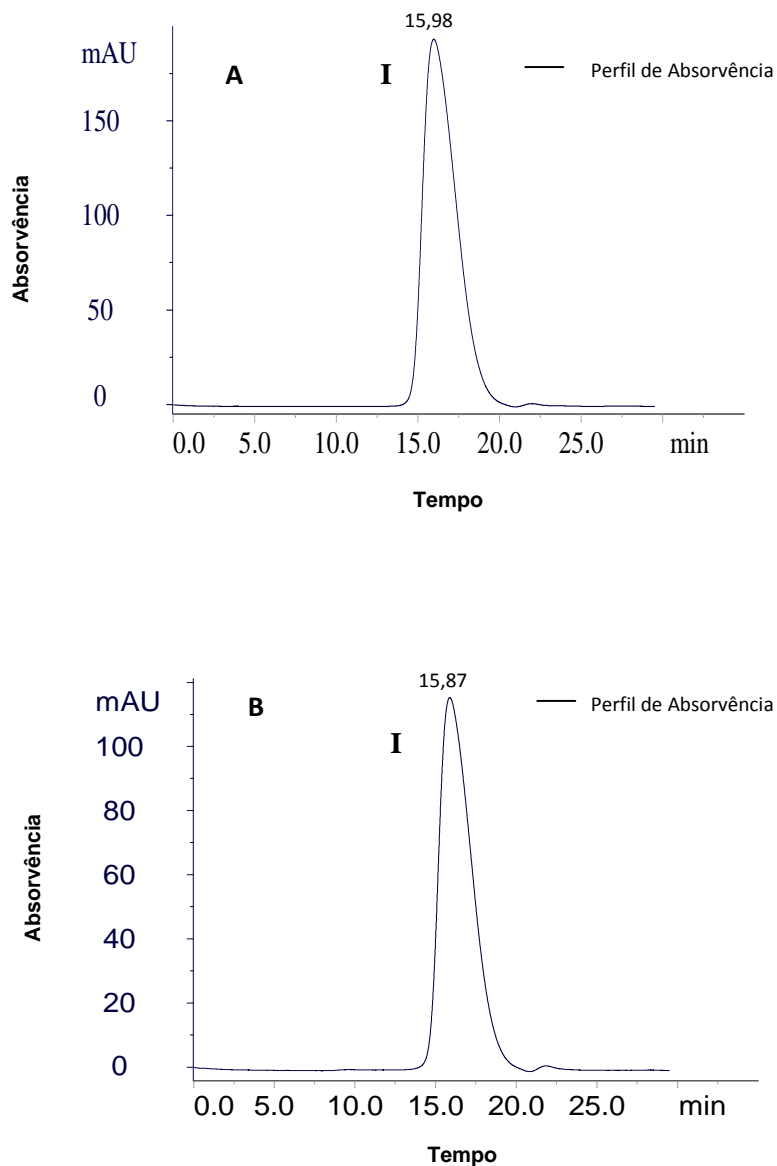


Figura 23 – Análise das frações de $F(ab)_2$ por cromatografia analítica de exclusão molecular. A – Perfil cromatográfico da amostra de $F(ab)_2$ sem Tris-HCl; B- Perfil cromatográfico da amostra de $F(ab)_2$ com Tris-HCl

Tabela 6 – Tempos de retenção, área e altura dos cromatogramas da figura 23

Cromatograma	Picos	Tempo de retenção (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)
A	I	15,98	456,3121	193,338
B	I	15,87	268,5823	115,362

De acordo com os perfis cromatográficos que se encontram representados na figura 23, verifica-se que o fragmento $F(ab)'_2$ se encontra praticamente puro, não sendo detectado o pico correspondente ao anticorpo inteiro que tipicamente elui aos 14,60 min. Deste modo pode-se concluir que o processo de fragmentação aplicado é eficiente, com a obtenção do fragmento $F(ab)'_2$ com um tempo de retenção de aproximadamente 15,90 minutos, tempo coincidente com o obtido na análise do fragmento $F(ab)'_2$ puro.

Com base nestes cromatogramas foram calculados os rendimentos de purificação, especificamente 60% para o fragmento $F(ab)'_2$ resultante do processo de fragmentação sem a adição de Tris-HCl, e de 55% para o fragmento $F(ab)'_2$ resultante do processo de fragmentação ao qual se adicionou o tampão de Tris-HCl. Os resultados obtidos permitem concluir que as condições que oferecem um maior rendimento de purificação, correspondem ao processo de fragmentação sem a adição de Tris-HCl, isto é, sem a inibição da actividade da enzima. No entanto, os dois rendimentos de purificação obtidos encontram-se dentro dos parâmetros de pureza estabelecidos para esta técnica, que são aproximadamente de 50-80% para a purificação de IgG (Josic, D. and Lim, Y. 2001).

3.2.3 Ensaios de Redução e Diálise

O processo de redução, promovido pela acção de um agente redutor, têm por objectivo quebrar as ligações dissulfureto da região da hinge do fragmento $F(ab)'_2$, de modo a formar o fragmento reduzido $F(ab)'$. Tipicamente nesta fase, obtêm-se os perfis cromatográficos que se encontram representados na figura 24 e 25.

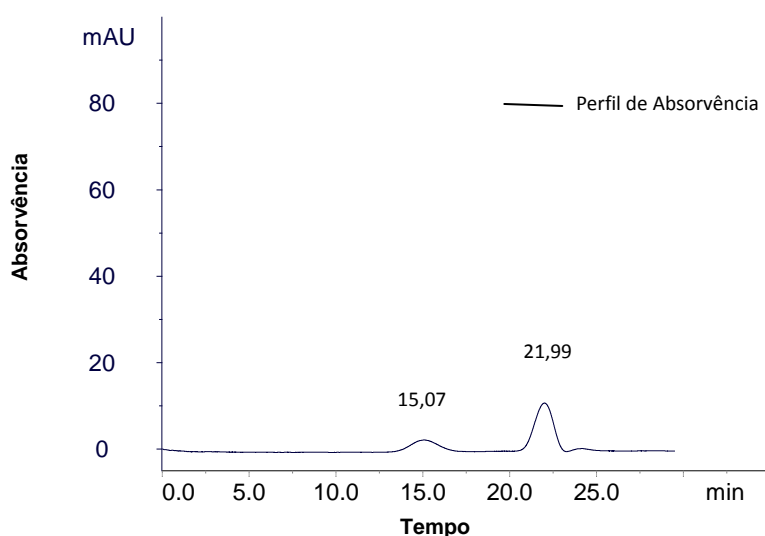


Figura 24 – Perfil cromatográfico do branco da reacção de redução

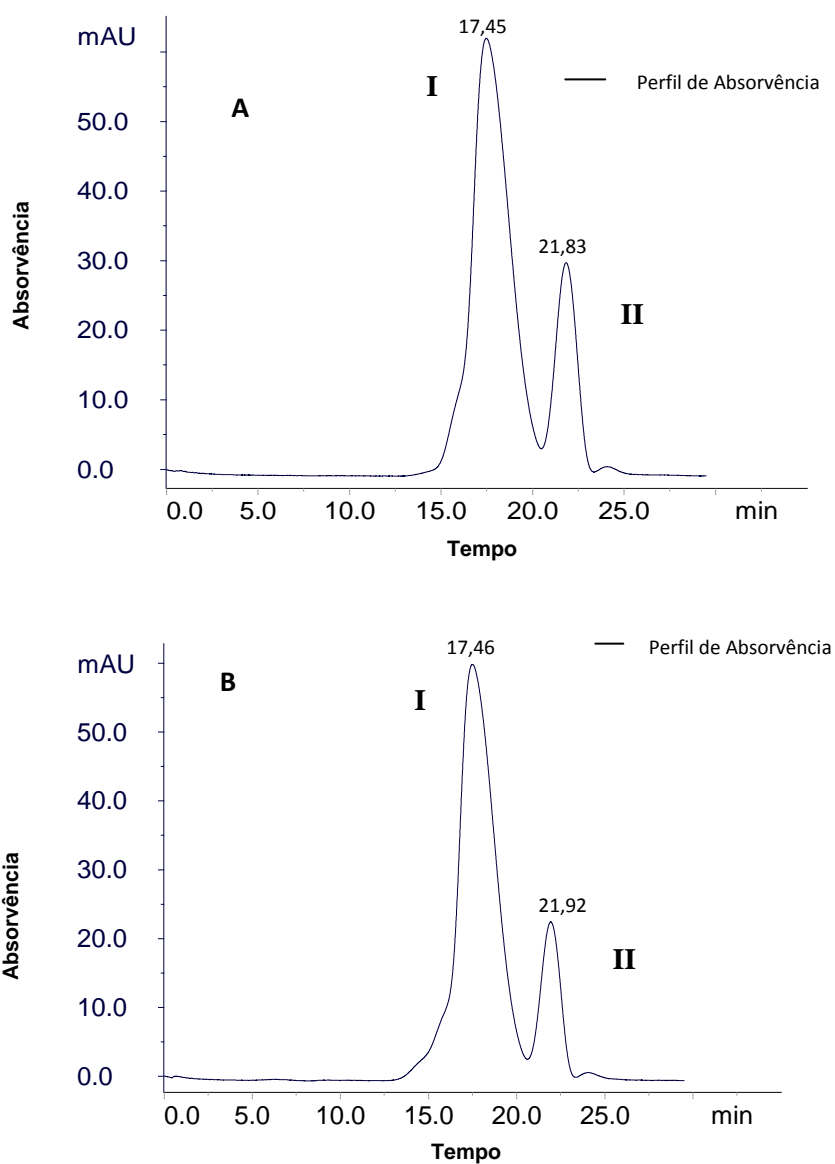


Figura 25 – Perfil cromatográfico da amostra de F(ab)₂ após o processo de redução. A- Cromatograma da análise de F(ab)₂ sem Tris-HCl após a redução; B- Cromatograma da análise de F(ab)₂ com Tris-HCl após a redução

Tabela 7 – Tempos de retenção, área e altura de picos dos cromatogramas apresentados na figura 25

Cromatograma	Picos	Tempo de retenção (min)	Área (mAU*min)	Altura (mAU)
A	I	17,45	149,8300	61,998
	II	21,83	40,3674	29,751
B	I	17,46	148,046	59,862
	II	21,92	29,3017	22,466

Uma vez que o fragmento $F(ab)'$ é resultado da redução do fragmento $F(ab)'_2$, este tem de possuir um tempo de retenção superior ao do fragmento $F(ab)'_2$, pois é mais pequeno que o fragmento $F(ab)'_2$. Este facto, pode ser verificado por observação dos perfis cromatográficos representados na figura 25, nos quais se observa um primeiro pico com um tempo de retenção de aproximadamente 17,45 minutos, que corresponde ao fragmento $F(ab)'$, seguido pela eluição do resto dos constituintes da reacção de redução. Facto que se pode comprovar pela análise do branco da solução de redução (sujeito às mesmas condições do processo de redução mas sem o fragmento $F(ab)'_2$ na mistura) que apresenta um tempo de retenção de aproximadamente 21,90 minutos (figura 25).

De forma, a eliminar o agente redutor da amostra do fragmento $F(ab)'$, procedeu-se à realização de uma diálise, obtendo-se o perfil cromatográfico que se pode observar na figura 26.

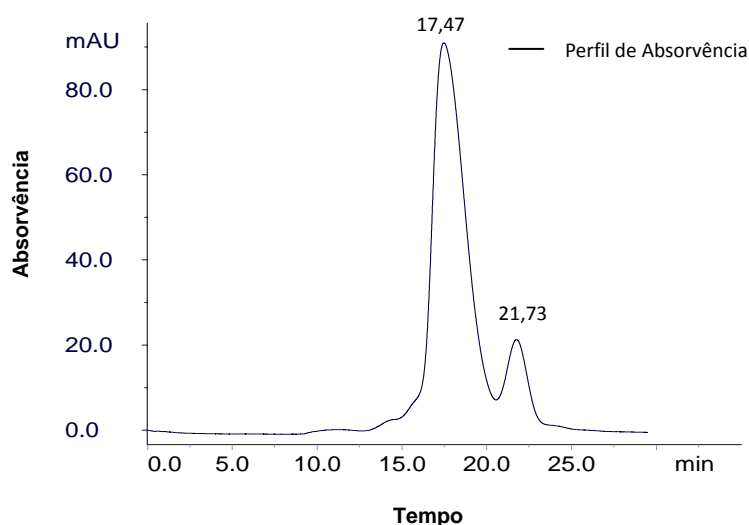


Figura 26 – Perfil cromatográfico resultante da diálise da amostra resultante da reacção de redução do fragmento $F(ab)'_2$

No entanto, não se verifica uma alteração significativa nos valores da área e altura do pico, correspondente ao agente redutor.

3.3 Estudo do anticorpo Anti-Avidin

O anticorpo Anti-Avidin foi desenvolvido para interagir especificamente com a proteína Avidin, que por sua vez interage com a molécula de biotina, também designada por vitamina H, vitamina B7 ou vitamina B8, dando origem ao sistema, avidina-biotina utilizado para a detecção de antígenos em linfócitos normais ou neoplásicos (Wood, G. and Warnke, R. 1981).

3.3.1 Fragmentação do anticorpo Anti-Avidin

O processo de fragmentação do anticorpo têm por objectivo, dividir a biomolécula, de forma a obter a região de ligação ao antígeno, fragmento $F(ab)'_2$ (região de interesse) e o fragmento cristalizável Fc. Para controlar o processo, é necessário primeiro proceder à caracterização do anticorpo inteiro e do fragmento $F(ab)'_2$ puro, recorrendo à utilização da técnica de cromatografia analítica de filtração em gel, obtendo-se como resultado os perfis cromatográficos que se encontram na figura 27.

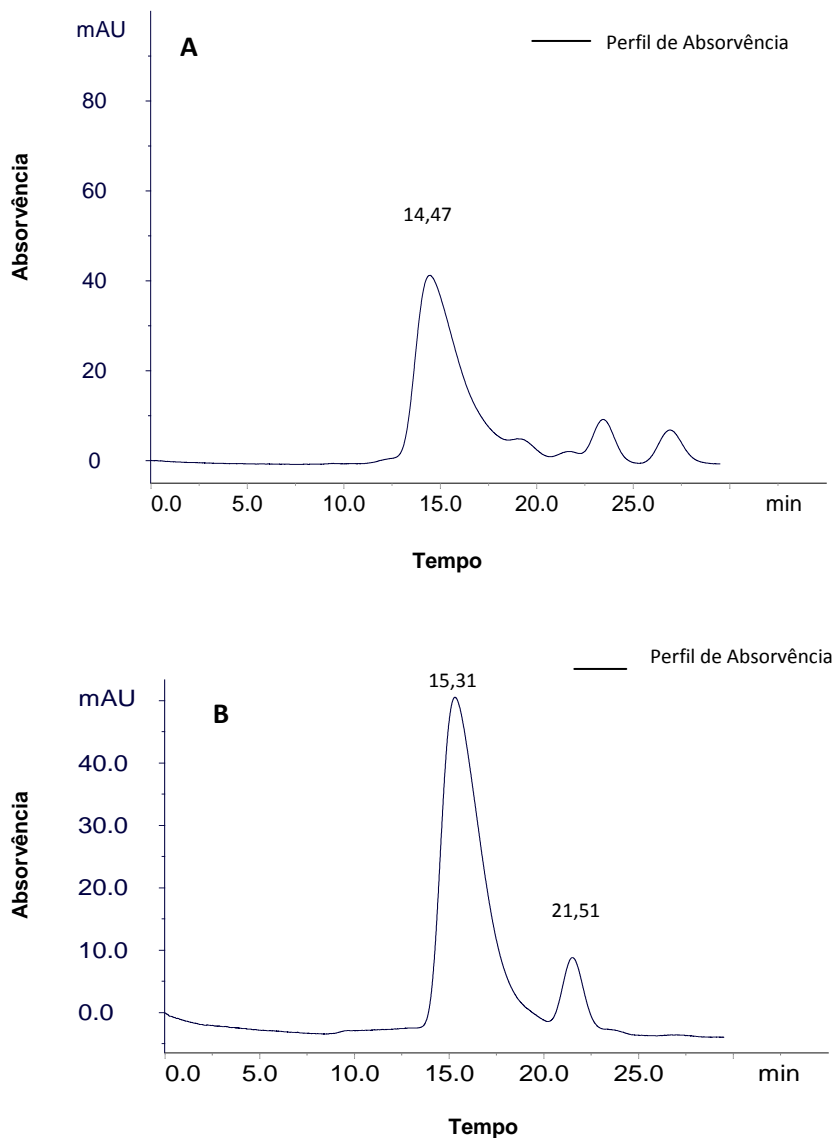


Figura 27 – Estudo do comportamento do anticorpo Anti-Avidin e do fragmento $F(ab)'_2$ de Anti-Avidin puro. A- Anticorpo Anti-Avidin; B- $F(ab)'_2$

Como, a técnica cromatográfica SEC, promove a separação das biomoléculas com base na diferença de tamanho, a molécula de maiores dimensão, neste caso o anticorpo inteiro que possui um peso aproximado de 150 KDa, foi eluído em primeiro lugar apresentando um tempo de retenção, de 14,47 min, enquanto que o fragmento $F(ab)'_2$, de peso molecular de 118 KDa, eluí mais tarde, apresentando um tempo de retenção de 15,31 min. Os tempos de retenção registados tanto para o anticorpo inteiro, como para o fragmento $F(ab)'_2$, são muito semelhantes aos registados nos estudos para o anticorpo Anti-CRP.

3.3.2 Purificação do fragmento F(ab)₂

De forma a purificar o fragmento F(ab)₂, sem comprometer a estrutura e actividade biológica do fragmento, utilizou-se a técnica de SEC, tendo sido obtido o cromatograma representado na figura 28.

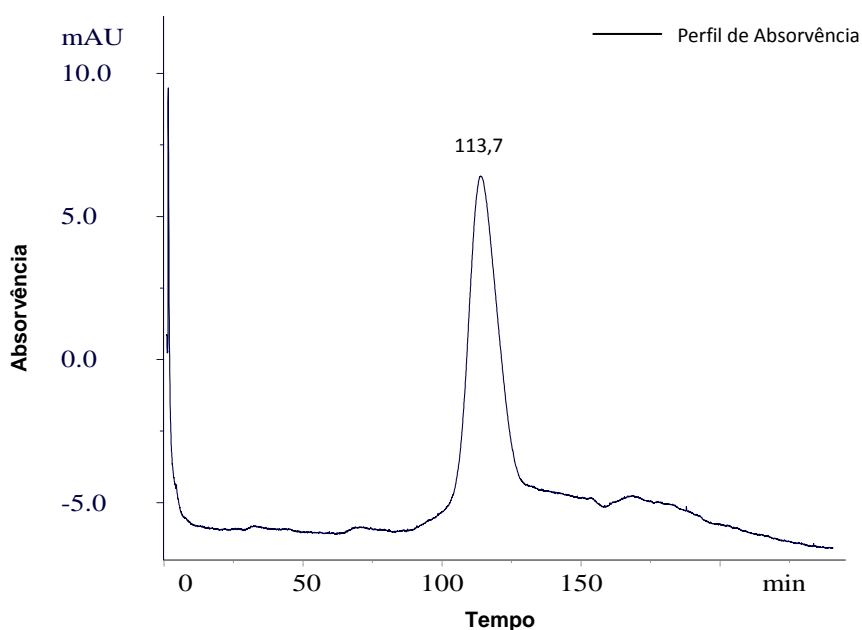


Figura 28 – Perfil cromatográfico do fragmento F(Ab)₂ Anti-Avidin por exclusão molecular.

Com base nas características da técnica de SEC, sabe-se que o primeiro pico do perfil cromatográfico representado na figura 28, corresponderá ao fragmento F(ab)₂, de peso molecular de 118 KDa, sendo este o primeiro componente a eluir, com um tempo de retenção aproximado de 114 minutos, seguindo-se a eluição dos restantes componentes da mistura da reacção de fragmentação.

De forma a avaliar o grau de pureza da fracção que corresponde ao fragmento F(ab)₂, realizou-se uma análise por cromatografia analítica de exclusão molecular, obtendo-se o perfil cromatográfico da figura 29.

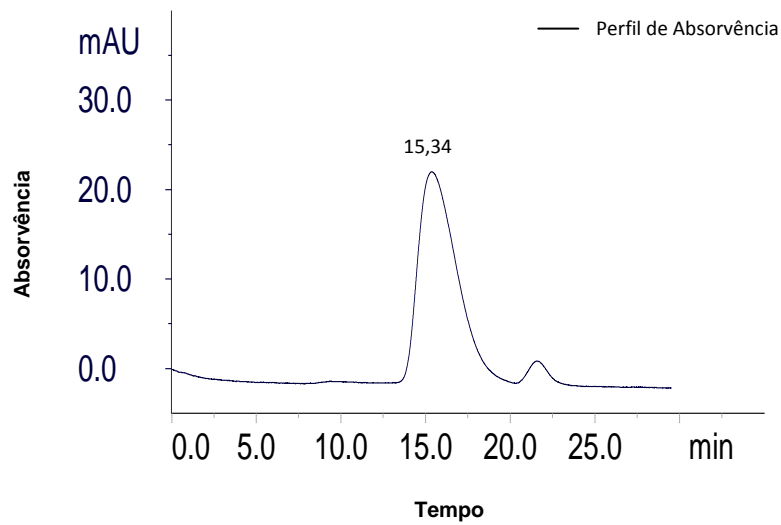


Figura 29 – Análise das fracções de F(ab)₂ de Anti-Avidin obtidas na cromatografia preparativa por cromatografia analítica de exclusão molecular.

A observação do perfil cromatográfico obtido da análise da fracção de F(ab)₂ recolhida no processo de purificação, verifica-se que para além do pico correspondente ao fragmento F(ab)₂, existe ainda um pico de contaminantes, o que indica que o processo de purificação implementado (1mL/min com um tampão de eluição de fosfato de potássio e NaCl a pH 6,9) não é totalmente eficiente. Deste modo torna-se necessário otimizar as condições de purificação do fragmento F(ab)₂, recorrendo à utilização de caudais mais baixos ou por utilização de uma coluna de maiores dimensões, antes da realização de estudos posteriores de redução e diálise.

3.4 Estudo do anticorpo Anti-PSA

Numa fase final do presente trabalho, começou-se a estudar o anticorpo Anti-PSA desenvolvido para interagir com o antígeno específico da próstata (PSA), proteína produzida pelas glândulas anais, que funciona como marcador biológico ou marcador tumoral.

3.4.1 Fragmentação do anticorpo

De forma a controlar o processo de fragmentação do anticorpo é fundamental primeiro, proceder-se à análise do anticorpo Anti-PSA. No entanto como este anticorpo se encontrava diluído numa pequena percentagem de azida foi necessário proceder-se à realização de um processo de diálise do anticorpo contra uma solução de tampão de citrato a pH 3,5 e de forma a eliminar a azida. Nesta fase os perfis cromatográficos obtidos podem ser visualizar na figura 30

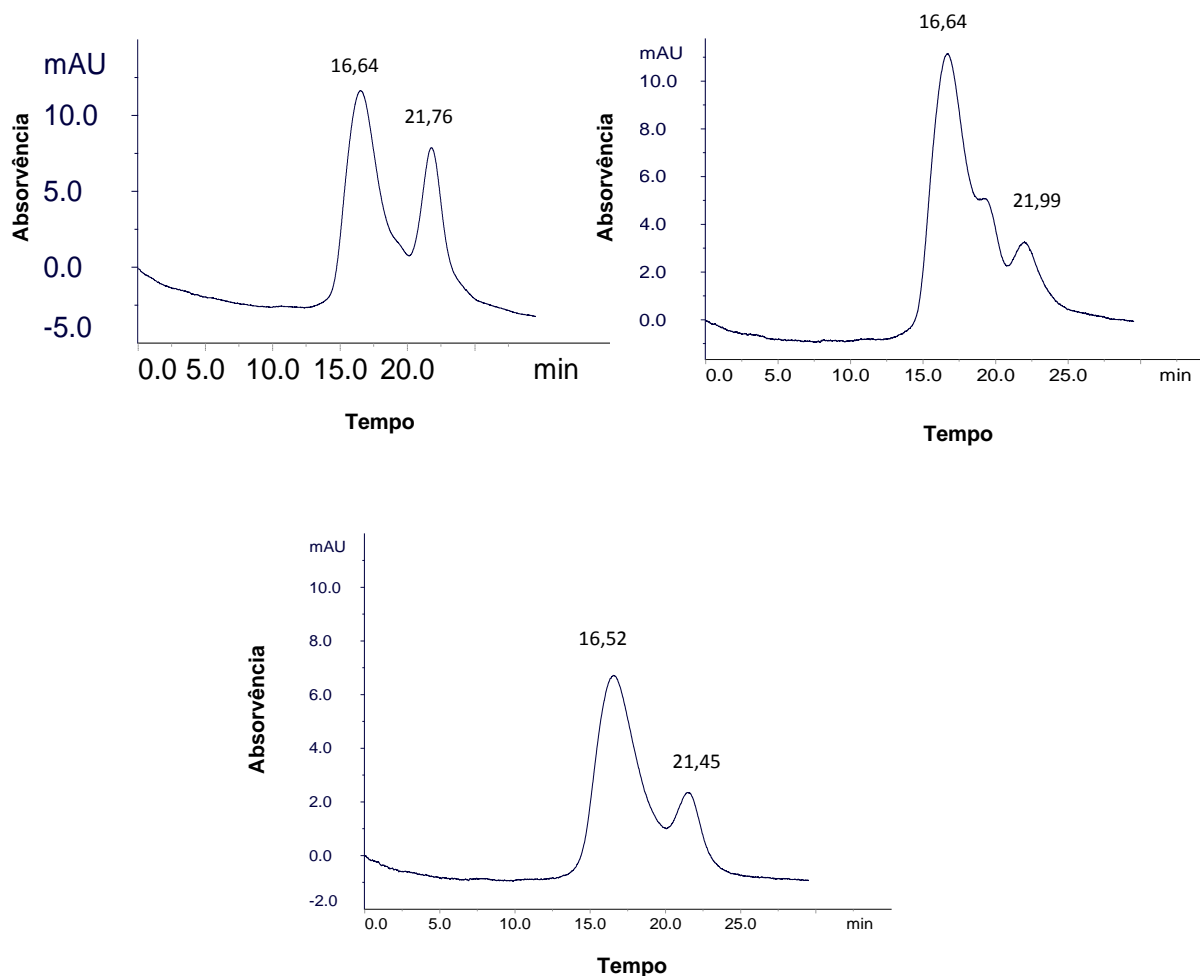


Figura 30 – Perfis cromatográficos do anticorpo Anti-PSA. A- Análise do anticorpo Anti-PSA sem diálise; B- Análise do anticorpo Anti-PSA com 1h de diálise; C- Análise do anticorpo Anti-PSA com 2h, de diálise.

De acordo com os perfis cromatográficos obtidos, verifica-se que o processo de diálise promove uma crescente diminuição do pico que corresponde aos contaminantes. Especificamente o melhor perfil cromatográfico quando a amostra é sujeita a uma diálise de 2h contra o tampão citrato a pH 3,5. Pode ainda verificar-se, que o anticorpo apresenta um tempo de retenção mais elevado, de aproximadamente 16,50 minutos, que os registados para o anticorpo Anti-CRP e Anti-Avidn.A discrepância registada em relação aos tempos pode dever-se às diferenças estruturais e morfológicas que existem entre os diferentes anticorpos.

Após a optimização das condições de diluição do anticorpo, procedeu-se à reacção de fragmentação, obtendo-se o perfil cromatográfico que se encontra representado na figura 31.

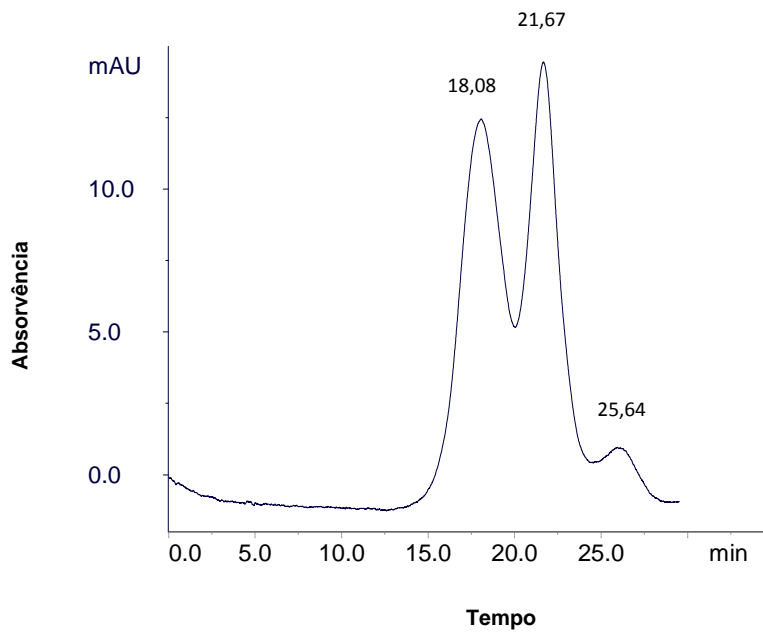


Figura 31 – Perfil cromatográfico da reacção de fragmentação do anticorpo Anti-PSA

Por análise do perfil cromatográfico obtido, verifica-se um aumento do tempo de retenção do pico correspondente ao fragmento $F(ab)'_2$, que é de aproximadamente 18 minutos, facto que é conducente com a diminuição de tamanho do fragmento obtido. Em estudos futuros, tornar-se-á necessário proceder à optimização das condições de purificação do fragmento $F(ab)'_2$ de forma a eliminar os contaminantes próprios da reacção de fragmentação.

IV. Conclusão e Perspectivas Futuras

Os anticorpos, tornaram-se moléculas de extrema importância, tanto a nível terapêutico, como para a utilização em dispositivos de detecção. As suas características funcionais, compelem a indústria farmacêutica a uma busca incansável para obter novos protocolos de manufaturação e purificação, que lhes permitam alcançar num curto espaço de tempo, a quantidade desejada de produto purificado. Este trabalho, que tinha como principal objectivo o desenvolvimento e implementação de um procedimento de purificação para o estudo de diferentes anticorpos, e respectivos fragmentos, é prova dessa meta traçada.

De forma a manter a actividade biológica do anticorpo, foi necessário ter em atenção as condições utilizadas no decorrer do processo de purificação. Para tal, foram optimizadas as condições dos diferentes ensaios, sendo escolhida para o desenvolvimento do trabalho, colunas de exclusão molecular, que permitiram obter um grau de purificação de 60%, valor que se encontra dentro dos parâmetros estabelecidos, para este tipo de técnica cromatográfica e para o estudo deste tipo de imunoglobulina (IgG), que é de aproximadamente 50 a 80% (Josic, D. and Lim, Y. 2001). No entanto, e por comparação dos perfis cromatográficos obtidos para os diferentes anticorpos analisados, verifica-se que cada anticorpo necessita de optimizações específicas e ajustadas no seu processo de purificação. Conclui-se também, que apesar da técnica de cromatografia de exclusão molecular permitir obter o grau de pureza desejado, esta, é uma técnica demorada, sendo necessário no futuro, o estudo de outros métodos cromatográficos que colmatem esta falha, sem comprometer a integridade do anticorpo a analisar.

V. Referências Bibliográficas

- Arosa, F.; Cardoso, E.; Pacheco, F.(2007), Fundamentos de Imunologia, pág 20, Lidel Edições técnicas lda
- Abbas, A. L., A.; Pober, J. (2003). Anticorpos e Antígenos. Imunologia Celular e Molecular, Revinter: 43-55.
- Birch, J. and A. Racher (2006). "Antibody production." *Advanced drug delivery reviews* **58**(5-6): 671-685.
- Borrebaeck, C. A. K. (2000). "Antibodies in diagnostics - from immunoassays to protein chips." *Immunology Today* **21**(8): 379-382.
- Brekke, O. and I. Sandlie (2003). "Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century." *Nature Reviews Drug Discovery* **2**(1): 52-62.
- Byrne, B., E. Stack, et al. (2009). "Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins." *Sensors* **9**(6): 4407.
- Cahill, D. J. (2001). "Protein and antibody arrays and their medical applications." *Journal of Immunological Methods* **250**(1-2): 81-91.
- Carson, K. (2005). "Flexibility-the guiding principle for antibody manufacturing." *Nature biotechnology* **23**(9): 1054-1058.
- Carter, P. (2006). "Potent antibody therapeutics by design." *Nature Reviews Immunology* **6**(5): 343-357.
- Chadd, H. and S. Chamow (2001). "Therapeutic antibody expression technology." *Current Opinion in Biotechnology* **12**(2): 188-194.
- Conroy, P., S. Hearty, et al. (2009). *Antibody production, design and use for biosensor-based applications*, Elsevier.
- Deisenhofer, J. (1981). "Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9 and 2.8Å resolution." *Biochemistry* **20**: 2361-2370.
- Disley, D., D. Cullen, et al. (1998). "Covalent coupling of immunoglobulin G to self-assembled monolayers as a method for immobilizing the interfacial-recognition layer of a surface plasmon resonance immunosensor." *Biosensors and Bioelectronics* **13**(11): 1213-1225.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." *Immunochemistry* **8**(9): 871.
- Flatman, S., I. Alam, et al. (2007). "Process analytics for purification of monoclonal antibodies." *Journal of Chromatography B* **848**(1): 79-87.
- Gagnon, P., E. Grund, et al. (1995). "Large-scale process development for hydrophobic interaction chromatography, Part 1: Gel selection and development of binding conditions." *BioPharm* **8**(3): 21-29.
- Gutiérrez-Gallego, R., J. Bosch, et al. (2009). "Surface plasmon resonance immuno assays—A perspective." *Growth Hormone & IGF Research* **19**(4): 388-398.
- Hamilton, R. (2001). *The Human IgG Subclasses*, Calbiochem-Novabiochem Corporation.
- Helm, C., J. Israelachvili, et al. (1989). "Molecular mechanisms and forces involved in the adhesion and fusion of amphiphilic bilayers." *Science* **246**(4932): 919.
- Hjelm, H. and K. Hjelm (1972). "Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins." *FEBS letters* **28**(1): 73.
- Huse, K., H. Böhme, et al. (2002). "Purification of antibodies by affinity chromatography* 1." *Journal of biochemical and biophysical methods* **51**(3): 217-231.
- International, C. (2010). *Introduction to Antibodies*.
- Josic, D. and Y. Lim (2001). "Analytical and preparative methods for purification of antibodies." *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* **39**(3): 215-226.
- Kent, U. (1999). "Purification of antibodies using affinity chromatography." *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY-CLIFTON THEN TOTOWA-* **115**: 23-28.

- Köhler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity."
- Kozlowski, S. and P. Swann (2006). "Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies." *Advanced drug delivery reviews* **58**(5-6): 707-722.
- Kronvall, G. (1973). "A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A-containing staphylococci." *Journal of medical microbiology* **6**(2): 187.
- Kumbhat, S., K. Sharma, et al. (2010). "Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Lee, W., B.-K. Oh, et al. (2005). "Immobilization of antibody fragment for immunosensor application based on surface plasmon resonance." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **40**(3-4): 143-148.
- Lemke, T. W., D.; Roche, V.; Zito, S. (2008). *Medicinal Chemistry*, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins: 148-151.
- Lima, N. M., M. (2003). *Imunologia Aplicada. Biotecnologia, Fundamentos e Aplicações*, Lidel-edições técnicas, lda: 84.
- Lipman, N., L. Jackson, et al. (2005). "Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources." *ILAR JOURNAL* **46**(3): 258.
- Low, D., R. O'Leary, et al. (2007). "Future of antibody purification." *Journal of Chromatography B* **848**(1): 48-63.
- Ninfa, A. B., D.; Benore, M. (2010). *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*, John Willey & Sons, Inc.
- Oh, B., Y. Kim, et al. (2003). "Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance." *Biosensors and Bioelectronics* **18**(5-6): 605-611.
- Pereira, M. and E. Lai (2008). "Capillary electrophoresis for the characterization of quantum dots after non-selective or selective bioconjugation with antibodies for immunoassay." *Journal of Nanobiotechnology* **6**(1): 10.
- Rosenau, B., K. Costenbader, et al. (2008). "C-reactive protein, anti-C-reactive protein antibodies and clinical atherosclerosis." *Vascular Medicine* **13**(1): 25.
- Schmidell, W. L., U.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). *Purificação de Produtos Biotecnológicos. Biotecnologia Industrial*, Editora Edgard Blücher Ltda. **2**: pág. 493.
- Scott, R. (2003). "Principles and practice of chromatography, Series: The Instant Chromatography Reference Library, published by Library4Science, Copyright.
- Shakib, F. and D. Stanworth (1980). "Human IgG subclasses in health and disease (A review) Part II." *International Journal of Clinical & Laboratory Research* **10**(4): 561-580.
- Shukla, A., B. Hubbard, et al. (2007). "Downstream processing of monoclonal antibodies-- Application of platform approaches." *Journal of Chromatography B* **848**(1): 28-39.
- Steinmeyer, D. E. and E. L. McCormick (2008). "The art of antibody process development." *Drug Discovery Today* **13**(13-14): 613-618.
- Svasti, J. and C. Milstein (1972). "The disulphide bridges of a mouse immunoglobulin G1 protein." *Biochemical Journal* **126**(4): 837.
- Thillaivinayagalingam, P., J. Gommeaux, et al. (2010). "Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors." *Journal of Chromatography B* **878**(2): 149-153.
- Walsh, G. (2003). *Antibodies Architecture Biopharmaceuticals*, Biochemistry and Biotechnology. Wiley: 418-419.
- Wood, G. and R. Warnke (1981). "Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **29**(10): 1196.

Yalow, R. and S. Berson (1959). "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods."